

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Regulation der Genexpression	1
2.	Lichtregulierte Genexpression bei Pflanzen	2
2.1.	Lichtregulierte Transkription nukleärer Gene	3
2.2.	Das <i>rbcS</i> Gen	4
2.3.	Photorezeptoren	5
2.4.	Cis- und Trans-Komponenten der <i>rbcS</i> Gene	7
II.	Problemstellung	11
III.	Material und Methoden	14
1.	Material	14
1.1.	Pflanzenmaterial	14
1.2.	Bakterienstämme	14
1.3.	Phagen	14
1.4.	Plasmide	15
1.5.	Chemikalien und Enzyme	17
1.6.	Nährmedien	18
2.	Methoden	18
2.1.	Pflanzenanzucht	18
2.2.	RNA-Isolierung	18
2.3.	Plasmid-Isolierung	19
2.4.	DNA-Sequenzierung	19
2.4.1.	Denaturierung der DNA	19
2.4.2.	Hybridisierung des Primers an die DNA	19
2.4.3.	Sequenzierungsreaktion	20
2.5.	Radioaktive Markierungen	21
2.5.1.	"Nick-Translation"	21
2.5.2.	3'-Endmarkierung mit DNA-Polymerase I	21
2.5.3.	5'-Endmarkierung mit T4-Polynukleotidkinase	22
2.5.4.	5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden	22
2.5.5.	<i>In vitro</i> Transkription	22
2.6.	Nukleinsäure-Transfer	23
2.6.1.	"Northern"-Transfer	23
2.6.2.	"Southern"-Transfer	23
2.6.3.	"Dot Blot"-Technik	23

2.7.	Hybridisierungen	24
2.7.1.	RNA/RNA Hybridisierung	24
2.7.2.	RNA/Oligonukleotid Hybridisierung	24
2.7.3.	DNA/DNA Hybridisierung	25
2.7.4.	DNA/RNA Hybridisierung	25
2.8.	Exonuklease III-Technik	25
2.9.	RNA-Kartierung mittels Nuklease S1-Technik	27
2.10.	Anlage und Analyse einer genomischen Bank	27
2.10.1.	DNA-Isolierung	27
2.10.2.	Partielle Restriktion	28
2.10.3.	Ligation und Verpackung	28
2.10.4.	Plaque-Filterhybridisierung	28
2.10.5.	Isolierung von Lambda-DNA	29
2.11.	Herstellung von Gesamtzellextrakten	30
2.12.	Gel-Bindungstest ("Gel Retardation Assay")	30
2.13.	"DNase I-Footprinting"	31
2.14.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.14.1.	Native Polyacrylamidgele	31
2.14.2.	Denaturierende harnstoffhaltige-Polyacrylamidgele	32
2.15.	Sicherheitsmaßnahmen	32
IV.	Ergebnisse	33
1.	<i>RbcS</i> Genexpression in Abhängigkeit vom Licht und Entwicklungsstadium	33
1.1.	"Northern"- und "Dot Blot"-Analyse der <i>rbcS</i> Gesamt-Transkripte	33
1.2.	Quantifizierung der <i>rbcS</i> Gesamt-Transkripte	37
1.3.	"Northern"-Analyse einzelner Mitglieder der <i>rbcS</i> Multigenfamilie	39
1.4.	Quantifizierung der spezifischen Transkripte dreier Mitglieder der <i>rbcS</i> Multigenfamilie aus <i>Brassica napus</i>	43
2.	Organspezifische <i>rbcS</i> Genexpression	44
3.	Analyse der genomischen DNA aus <i>Brassica napus</i>	46
3.1.	Anlage einer <i>Brassica napus</i> -Genbank in dem Vektor EMBL3	46
3.2.	Identifizierung und Restriktionsanalyse von <i>rbcS</i> Klonen	48
3.3.	Sequenzierung eines <i>rbcS</i> Gens aus <i>Brassica napus</i>	50
3.4.	Kartierung des Transkriptions-Startpunkts mit Nuklease S1	54
4.	Untersuchung von DNA-Protein-Wechselwirkungen im nicht-kodierenden <i>rbcS</i> 5'-Bereich	58
4.1.	DNA-Protein Gel-Bindungstest mit Extrakten aus Lichtkeimlingen	59
4.2.	DNA-Protein Gel-Bindungstest mit Extrakten aus Dunkelkeimlingen	61
4.3.	Gel-Bindungsstudien mit den Fragmenten KS320 und KS540	62

4.4.	Eingrenzung des Protein-Bindebereichs durch Analyse von Deletionsklonen	65
4.5.	"DNase I-Footprinting"	68
V.	Diskussion	72
1.	Regulation der <i>rbcS</i> Genexpression in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand und den Lichtverhältnissen	72
1.1.	Analyse der <i>rbcS</i> Gesamt-Transkripte	72
1.2.	Analyse der unterschiedlichen Genexpression von drei Mitgliedern der <i>rbcS</i> Multigenfamilie	74
2.	Organspezifische <i>rbcS</i> Genexpression	76
3.	Isolierung und Sequenzierung eines <i>rbcS</i> Gens aus <i>Brassica napus</i>	78
3.1.	Sequenzvergleich in der kodierenden Region	78
3.2.	Analyse regulatorischer DNA-Sequenzen (Cis-Elemente)	80
4.	Funktionelle Charakterisierung von DNA-Protein-Wechselwirkungen im <i>rbcS</i> 5'-Bereich	81
5.	Vergleich der DNA-Bindungsaktivität in Extrakten aus Licht- und Dunkelkeimlingen	85
6.	Modell der analysierten DNA-Protein-Wechselwirkung	88
VI.	Zusammenfassung	90
VII.	Literatur	92