

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Die Rolle der Abscisinsäure bei der Regulation der Stomatabewegung und der Genexpression	1
1.2	Expression von Antikörpern und Antikörperfragmenten in Pflanzen	3
1.3	Immunmodulation der Abscisinsäureaktivität in transgenen Tabakpflanzen	4
1.4	"High-throughput"-Methoden zur Analyse der differentiellen Genexpression	6
1.4.1	Offene Systeme zur Untersuchung der differentiellen Genexpression	7
1.4.2	DNA-"Arrays"	9
1.5	Zielstellung der Arbeit	13

2. Material

2.1	Pflanzenmaterial	14
2.2	Bakterienstämme und Phagen	14
2.3	Vektoren und Primer	14
2.4	Enzyme	15
2.5	Pflanzenhormone und Antibiotika	15
2.6	Antikörper und Konjugate	15
2.7	DNA- und Proteinmarker	15
2.8	Weitere Chemikalien und Kits	15
2.9	Medien	16
2.10	Puffer und weitere Lösungen	17
2.11	Geräte und Software	17
2.12	Spezielle Materialien	18

3. Methoden

3.1	Normalisierung von anti-ABA-scFv transgenen Pflanzen durch Behandlung mit Abscisinsäure	18
3.1.1	Anzucht der Pflanzen und Behandlung mit Abscisinsäure	18
3.1.2	Biochemische und physiologische Untersuchungen	19
3.1.2.1	Nachweis des scFv-Proteins mittels "Western blot"	19
3.1.2.2	Bestimmung des Gesamt-ABA-Gehaltes	20
3.1.2.3	Berechnung der theoretisch freien ABA	21

3.1.2.4 Gaswechselfmessungen	22
3.2 Molekularbiologische Standardprozeduren	22
3.3 Cosmidbank TLC	23
3.3.1 Isolation hochmolekularer genomischer DNA	23
3.3.2 Herstellung und erste Charakterisierung der Cosmidbank	24
3.3.3 Ordnen der Cosmidbank durch "Picking" und "Spotting"	24
3.3.4 Prozessierung der Koloniefilter (Cosmide und Plasmide)	25
3.4 Präparation der komplexen cDNA	26
3.4.1 Präparation epidermaler Fragmente	26
3.4.2 GTC-RNA-Extraktion	26
3.4.3 Reinigung der mRNA	27
3.4.4 Synthese der komplexen cDNA	27
3.5 Stomata cDNA-Bank TStP	28
3.5.1 Herstellung der Stomata cDNA-Bank TStP	28
3.5.2 Ordnen der cDNA-Bank durch "Picking" und "Spotting"	28
3.6 cDNA-Plasmid-"Arrays" für die "reversed Northern"-Analyse	29
3.7 Hybridisierungen und Auswertung	29
3.7.1 Hybridisierung der Kolonie- und Plasmid-Filter mit radioaktiv markierten Sonden	29
3.7.2 Hybridisierung von Plasmidfiltern mit nichtradioaktiv markierten Sonden	30
3.7.3 Qualitative und quantitative Auswertung der Images	31
4. Ergebnisse	
4.1 Normalisierung der anti-ABA scFv transgenen Tabakpflanzen	32
4.1.1 Die externe, langfristige Gabe von 50 µM ABA normalisiert den spezifischen Phänotyp der RA-Pflanzen	32
4.1.1.1 Erstes Komplementationsexperiment	32
4.1.1.2 Zweites Komplementationsexperiment	36
4.1.2 Kurzzeitbehandlung der transgenen Pflanzen durch ABA-Gabe über die Blattstiele führt nicht zu einer Normalisierung	40
4.1.3 Bei langzeitbehandelten RA-Pflanzen kann der Stomataschluß durch ABA-Gabe über die Blattstiele wieder induziert werden	41

4.1.4	In wasser- und ABA-behandelten RA-Pflanzen kann nahezu die gesamte Abscisinsäure vom Antikörper gebunden werden	42
4.2	Molekulare Charakterisierung der anti-ABA Immunglobulintransgenen Tabakpflanzen	43
4.2.1	Herstellung und erste Charakterisierung der Cosmidbank TLC	44
4.2.2	Organellogenome und chromosomale rRNA-Gene in der Cosmidbank	45
4.2.3	Komplexe Analyse der Genexpression in Wildtyp- und RA-Pflanzen mit Hilfe der Cosmidbank	47
4.2.3.1	Charakterisierung des Expressionsmusters im Blatt	49
4.2.3.2	Charakterisierung des Expressionsmusters in den epidermalen Fragmenten	53
4.2.4	Herstellung und erste Charakterisierung der schließzellspezifischen cDNA-Bank	56
4.2.5	Charakterisierung der geordneten schließzellspezifischen cDNA-Bank TStP	57
4.2.5.1	Nutzung der geordneten cDNA-Bank TStP zur Identifizierung interessanter Cosmidklone und häufiger Transkripte in der cDNA-Bank	57
4.2.5.2	Sequenzanalyse von 281 zufällig ausgewählten cDNA-Klonen der schließzellspezifischen cDNA-Bank	59
4.2.6	Komplexe Analyse der Genexpression in Schließzellen von RA- und Wildtyppflanzen mittels der geordneten schließzellspezifischen cDNA-Bank	63
4.2.7	Vergleich der Genexpression in Schließzellen und Blatt mittels der schließzellspezifischen cDNA-Bank	66
4.2.8	Untersuchung des Einflusses der Langzeitbehandlung mit ABA auf die Genexpression in Schließzellen mit Hilfe der geordneten cDNA-Bank	76
4.3	Die Morphologie der Schließzellen ist in den RA-Pflanzen verändert	80
5.	Diskussion	
5.1	RA-Pflanzen weisen einen spezifischen, morphologisch und physiologisch veränderten Phänotyp auf	82
5.2	Die Behinderung des Stomataschlusses in den RA-Pflanzen ist auf die Wirkung des anti-ABA-Einzelkettenantikörpers zurückzuführen	83
5.3	Mechanismen der Modulation von ABA-Wirkungen durch das anti-ABA scFv-Protein	84
5.4	In Hybridisierungsstudien mit radioaktiv markierten komplexen Proben können häufige und mittelhäufige Transkripte untersucht werden	89

5.5	Die durch Immunmodulation und Normalisierung erzielten Effekte lassen sich auf Transkriptionsebene in den voll entwickelten Pflanzen nicht erfassen	90
5.6	Abscisinsäure ist für die Entwicklung funktionsfähiger Schließzellen notwendig	91
6.	Zusammenfassung	95
7.	Literaturverzeichnis	97

Abkürzungen

ABA	<i>cis, trans</i> -Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ai	ABA-induzierbarer Klon
Amp ^r	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c _a	Kohlendioxidkonzentration
Cab	Chlorophyll a/b-bindendes Protein
CaMV	"cauliflower mosaic virus", Blumenkohl-Mosaik-Virus
cDNA	"complementary" DNA, komplementäre DNA
CIAP	"calf intestinal alkaline phosphatase", alkalische Phosphatase
cfu	"colony forming units", koloniebildende Einheiten
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DK	differentieller Klon
DTT	Dithiothreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EST	"expressed sequence tag"
g	Gramm, Erdbeschleunigung
g _L	stomatäre Leitfähigkeit
I	Lichtintensität
KDEL	Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin-Peptid
LK	Leitklon
M	Molarität
μ	mikro
MB	Megabyte

min	Minute
mRNA	"messenger", Boten-Ribonukleinsäure
MMLV	"Moloney Murine Leukemia Virus"
n	nano
OD	optische Dichte
PBS	"phosphate-buffered saline", phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	"polymerase chain reaction", Polymerasekettenreaktion
pfu	"plaque forming units", plaquebildende Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Rubisco	Ribulose-1,5-biphosphatcarboxylase
scFv	"single chain variable fragment", Einzelkettenantikörper
SDS	"sodium dodecyl sulfate", Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tet ^r	Tetracyclinresistenz
TLC	"tobacco leaf cosmids", Tabakblatt-Cosmide (genomische Bank)
Tris	Tris- hydroxymethylaminomethan
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TSP	"total soluble protein", gesamtlösliches Protein
TStP	"tobacco stomata phagemide", schließzellspezifische cDNA-Bank aus Tabak
UE	Untereinheit
V	Volumen, Volumina bzw. Volt
V _H	variabler Teil der schweren Antikörperkette
V _L	variabler Teil der leichten Antikörperkette
Wo.	Woche
YAC	"yeast artificial chromosome", künstliches Hefechromosom