

4543 - 635 4

Versuche zur Übertragung der cDNA einer Glycerin-3-
Phosphat-Acyltransferase aus *Pisum sativum* L.
in *Cucumis sativus* L.

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Angela Kuch
aus Berlin



Hamburg 1997

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

I. Einleitung	Seiten
1. Zur Bedeutung der Gattung <i>Cucumis sativus</i> L.	1
2. Kühlesensitivität von Pflanzen	5
3. Lipidkomponenten pflanzlicher Membranen	8
4. Glycerolipidbiosynthese in Pflanzen	10
5. Phasenumwandlung in Zellmembranen	13
6. Pflanzliche Acyltransferasen und ihre Bedeutung für die Kühlesensitivität	15
7. Einfluß von Phosphatidylglycerin auf Phasenumwandlungen	16
8. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	18
II. Material und Methoden	
1. Geräte und Hersteller	24
2. Bakterienstämme, Plasmide und Vektoren	25
2.1 Stämme und Herkunft	25
2.2 Bakterienanzucht	26
2.3 Plasmid-DNA-Isolierungen aus <i>E. coli</i> -Zellen	26
2.3.1 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung nach Birnboim & Doly (1979)	26
2.3.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung über Ionenaustauscher	27
2.3.3 Plasmid-DNA-Isolierung für Analysen nach Riggs & McLachlan (1986)	27
2.4 Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.5 Gelelektrophorese	28
2.6 Restriktionsenzyme, modifizierende Enzyme und Reaktionsbedingungen	29
2.6.1 Alkalische Phosphatase	29
2.6.2 Klenow-Fragment	29
2.6.3 Ligation mit T4-DNA-Ligase nach Cobiauchi & Wilson (1987)	30
2.7 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen nach Inoue et al. (1990)	30
3. Pflanzenmaterial	31
3.1 Art und Herkunft	31
3.2 Kultivierung	32
3.2.1 Oberflächensterilisierung von Samen	32
3.2.2 Anzucht steriler Sproßkulturen	32
3.2.3 Induktion und Kultur von Kallusgewebe	32
3.2.4 Regeneration über somatische Embryogenese	33
4. Suspensionskulturen	33
4.1 Anlegen einer Suspensionskultur	33
4.2 Kultivierung der Suspensionskultur	34

4.3	Subkultivierung von Suspensionskulturen	34
4.4	Bestimmung der Zelldichte (packed cell volume)	34
5.	Überführung der Pflanzen ins Gewächshaus	34
6.	Bestimmung der Selektionsbedingungen	35
7.	Biolistische Transformationsmethode	35
7.1	Versuche zur biolistischen Transformationsmethode	36
7.2	Herstellung des Fällungsansatzes für die Transformationsversuche	36
7.3	Histochemischer β -Glucuronidase-Test	37
8.	Lipidanalysen aus Blättern von <i>Cucumis sativus</i> L.	37
8.1	Extraktion pflanzlicher Lipide	37
8.2	Identifizierung über dünnschichtchromatographische Auftrennung	38
8.3	Bestimmung der Totalfettsäuren in Phosphatidylglycerin	39
8.4	Positionsanalysen	39
8.5	HPLC-Analyse (High Performance Liquid Chromatography)	40
9.	PCR-Analyse (Polymerasekettenreaktion)	40
9.1	Isolierung genomischer DNA für die PCR-Analyse	41
9.2	Auswahl der Oligonukleotid-Primer	42
9.3	PCR-Ansatz und Bedingungen	42
10.	Proteinanalysen	43
10.1	Proteinextraktion	43
10.1.1	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	44
10.1.2	Fällung der Proteine	44
10.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
10.3	Western-Blot-Analyse	46
10.3.1	Transfer der Proteine auf Nitrocellulose	46
10.3.2	Immunologischer Nachweis der Acyltransferase	47
11.	Messung des relativen Ioneneffluxes	48

III. Ergebnisse

1.	Versuche zur Regeneration von Gurkenpflanzen über somatische Embryogenese	49
1.1	Induktion von embryogenen Kalluskulturen aus Folgeblättern steriler Sproßkulturen und direkte Regeneration der somatischen Embryonen	51
1.2	Induktion von embryogenem Kallusgewebe als Ausgangsmaterial für Suspensionskulturen	54
1.3	Charakterisierung der Suspensionskulturen	55
1.4	Regeneration von Pflanzen aus Suspensionskulturen	56
2.	Bestimmung von <i>in vitro</i>-Selektionsbedingungen	59
3.	Klonierung der cDNA für die Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase in einen Vektor	63

4.	Biolistische Transformationsmethode	64
4.1	Auswahl von Parametern für die Transformation mit der Partikelkanone	64
4.1.1	Test verschiedener Pflanzengewebe zur Transformation	65
4.1.2	Einfluß des 1'-Promotors auf die transiente Expression	65
4.1.3	Schwankungsbreite einzelner Ergebnisse unter gleichen Bedingungen	66
4.1.4	Abstand zwischen Stopplatte und Zielzellen	67
4.1.5	Vergleich der transienten GUS-Aktivität bei Suspensionskulturen	69
4.1.6	Zusammenfassung der Parameter für die Transformation	70
4.2	Versuche zur stabilen Transformation	71
4.2.1	Transformation von Zellen in ausplattierten Suspensionskulturen	71
4.2.2	Transformation von Zellen in Blattexplantaten mit der Partikelkanone	72
5.	Analysen der transformierten pflanzlichen Gewebe	73
5.1	Nachweis der stabilen <i>uidA</i> -Expression	73
5.2	Analysen transformierter Pflanzen mittels PCR	76
5.3	Western-Blot-Analysen hygromycinresistenter Suspensionskulturen und regenerierter Pflanzen	77
6.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Kallus- und Suspensionskulturen sowie von regenerierten und transformierten Pflanzen	80
7.	Bestimmung des Schädigungsgrades an <i>Cucumis sativus</i> L. nach einer Kühlebehandlung durch Messung des relativen Ioneneffluxes	84
8.	Lipidanalysen aus Blättern von <i>Cucumis sativus</i> L.	86
8.1	Analysen von Pflanzen auf Erde	86
8.2	Lipidanalyse einer regenerierten und transformierten Gurkenpflanze	90

IV. Diskussion

1.	<i>In vitro</i> -Regenerationssysteme bei <i>Cucumis sativus</i> L.	94
2.	Bestimmung der Selektionsbedingungen und der Transformationsmethode	99
3.	Analysen transformierter pflanzlicher Gewebe	103

V. Zusammenfassung	112
---------------------------	-----

VI. Literaturverzeichnis	114
---------------------------------	-----

Anhang

Abbildungsverzeichnis	
Tabellenverzeichnis	
Verzeichnis der Poster und Vorträge	
Danksagung	
Lebenslauf	