

Facharbeit

Thema der Arbeit

**Genregulation durch die RNA-Interferenz bei belichteten und etiolierten
Erbsenkeimlingen**

Verfasser: Krause, Tom

Klasse: Q1 BIO LK1

Betreuende Lehrkraft: Herr Dr. F. Schaller

Abgabetermin: 22.12.15

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Einleitung	3
2 Material	4
2.1 Pflanzenmaterial	4
2.2 Chemikalien	4
2.3 Geräte und Verbrauchsstoffe	5
3 Methoden	6
3.1 Extraktion der Proteine aus dem Pflanzenmaterial	6
3.2 Trockengewicht und Frischgewicht im Vergleich	7
3.3 Extrahieren der Pigmente aus den Keimlingen	7
3.4 Dünnschichtchromatographie	8
3.5 Elution der Pigmente von der DC-Platte	9
3.6 Aufnahme von Absorptionsspektren pflanzlicher Pigmente	9
3.7 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes der Keimlinge	10
3.8 Gelelektrophorese	10
4 Ergebnisse	13
4.1 Vergleich des Phänotyps belichteter und unbelichteter Erbsenpflanzen	13
4.2 Frisch- und Trockengewicht der belichteten und unbelichteten Erbsenpflanzen im Vergleich	14
4.3 Dünnschichtchromatographie	15
4.4 Extinktionsspektren	16
4.5 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes der Keimlinge	17
4.6 Gelelektrophorese	17
5 Diskussion	21
6 Zusammenfassung	22
7 Literatur	23
8 Anhang	24
8.1 Praktikumsskript	24
9 Selbstständigkeitserklärung	25

1. Einleitung

In der folgenden Facharbeit sollen die Unterschiede der Proteinexpression bei Skoto- und Photomorphogenese in Erbsenkeimlingen im Hinblick auf die Erstellung einer Versuchsvorschrift in dem Fach Biologie dargestellt werden.

Pflanzen betreiben Photosynthese, um Energie zu gewinnen. Für diese und viele weitere Stoffwechselprozesse sind Proteine (Enzyme) essenziell. Stoffwechselprozesse sind nicht statisch und können durch Genregulation beeinflusst werden. Genregulation erfolgt in Form von „einschalten“ und „ausschalten“ von Genen. Sind Gene „ausgeschaltet“, so können die von ihnen codierten Proteine nicht mehr synthetisiert werden. Es gibt verschiedene Mechanismen zur Genregulation. Ein schon länger bekannter Mechanismus, ist der, auf der Ebene der Transkription. Bei diesem wird, durch Hormon gesteuerte, spezifische Transkriptionsfaktoren die Transkriptionsrate beeinflusst und so die Genexpression reguliert. Im Gegensatz dazu sind auch relativ neue Mechanismen auf der Ebene der RNA bekannt, also nach Abschluss der Transkription.

Eine dieser Mechanismen ist die der RNA-Interferenz, welche bewirkt, dass verschiedene Moleküle dafür sorgen, dass die m-RNA nicht translatiert wird. Sie ist ein post-transkriptionaler Mechanismus.

Essenziell der RNA-Interferenz sind die small interfering RNAs (kurz: siRNA) und micro RNAs (miRNA). Die siRNAs und miRNAs stammen von längeren doppelsträngigen RNA-Sequenzen ab, welche von der Zelle selbst synthetisiert werden und besitzen eine Länge von 21-23 Basenpaaren. Die siRNA wird, im Gegensatz zu der miRNA, welche im Zellkern produziert wird, im Cytoplasma hergestellt. Beide besitzen die identische Aufgabe der Proteinexpression und binden im Cytoplasma an das Enzym Dicer, welches beide in ihre eigentliche Länge zurecht schneidet. Anschließend binden die 21-23 Basenpaare langen Sequenzen an das Argonauten-Protein und teilen sich in Haupt- und Nebenstrang, wobei der Nebenstrang abgebaut wird und der Hauptstrang weiterhin an das Argonautenprotein bindet. Der entstandene Komplex wird als Risc bezeichnet, was genauso viel bedeutet, wie RNA induced silencing complex. Dieser Komplex bindet an eine komplementäre Sequenz der mRNAs. Das Argonautenprotein katalysiert dann die Spaltung der mRNA, welche dann abgebaut wird. Dieser sehr spezifische Vorgang, wird jedoch nur bei Risc's durchgeführt welche eine siRNA besitzen. Risc's, welche aus einer miRNA bestehen können an bis zu hunderten verschiedenen endogene RNA-Sequenzen binden. Hierbei ist aber die miRNA der Katalysator für die Spaltung.

Dieser Prozess ist nicht nur bei der Regulation der Proteinexpressivität, sondern auch

für die Verteidigung gegen Viren, welche aus RNA bestehen, hilfreich und überlebenswichtig für die Zelle. Die RNA-Interferenz ist noch ein relativ junges Thema und ist wegen ihrer Vielfältigkeit und im Besonderen wegen ihrer Notwendigkeit in den Zellen sehr interessant.

Des Weiteren bedeutet sie einen Meilenstein der Forschung, da so die Wirkung und die Bedeutung einzelner Proteine deutlich gemacht werden können, indem man deren Herstellung verhindert und so die Unterschiede, nach „knock out“, kenntlich gemacht werden. Diese Art der Funktionsbestimmung der Proteine ist wesentlich schneller, als die schon bekannten Prozesse. Zielsetzung dieser Facharbeit, ist die praktische Untersuchung der Proteinexpressivität von belichteten und unbelichteten Erbsenkeimlingen unter theoretischer Betrachtung der RNA-Interferenz. Dazu wurden, wie im Folgenden beschrieben, Versuche durchgeführt. (www.Youtube.com

www.Biosicherheit.de)

2 Material

2.1 Pflanzenmaterial

Von dem 23.09.2015 bis zu dem 4.10.2015 wurden jeden Tag Erbsen ausgesät, sowohl belichtet als auch unbelichtet. Zusätzlich wurden Nährstoffe und Wasser in ausreichenden Mengen regelmäßig den Erbsen zugesetzt.

2.2 Chemikalien

-Aceton tech.(C ₃ H ₆ O)	Carl Roth GmbH + Co. AG
-Ascorbinsäure (C ₆ H ₈ O ₆)	Merck KGaA
-Benzin	Carl Roth GmbH + Co. AG
-Calciumcarbonat (CaCO ₃)	Riedel-de Haën AG
-destilliertes Wasser (aqua destillata, A. dest.)	
-Diethylether (C ₄ H ₁₀ O)	Carl Roth GmbH + Co. AG
-Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Carl Roth GmbH + Co. AG
-n-Hexan (C ₆ H ₁₄)	Carl Roth GmbH + Co. AG
-Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Merck KGaA
-Laufmittel (Benzin, Isopropanol, A. Dest.)	eigene Herstellung

-Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. AG
-wasserfreies Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	Merck KGaA
-Seesand	Riedel-de Haën AG
-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (C ₄ H ₁₁ NO ₃ ·HCl)	Carl Roth GmbH + Co. AG

2.2.1 Chemikalien: Gelelektrophorese

- Sammelgelpuffer
 - 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
- Trenngelpuffer
 - 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
- Elektrolytlaufpuffer
 - 0,2 M Glycin
 - 0,025 M Tris
 - 0,1% SDS, pH 8,6
- SDS-Probenpuffer
 - 0,05 M Tris/HCl, pH 6,8
 - 17,2% Glycerin
 - 5% β-Mercaptoethanol
 - 4% SDS
 - 0,005% Bromphenolblau
- Färbelösung
 - 40% Methanol
 - 50% Wasser
 - 10% Essigsäure
 - 1,5% Serva Blau R
- Entfärbelösung
 - 40% Methanol
 - 50% Wasser
 - 10% Essigsäure

2.3 Geräte und Verbrauchsstoffe

- Abzug
 - Bechergläser 50 ml und 250ml
 - Dünnschichtchromatographie (DC)-Trennkammer
 - Eppendorf-Gefäße (Eppis) 1,5 ml und 2,2 ml
 - Eppendorf-Gefäßständer
- | |
|--------------|
| DESAGA GmbH |
| Eppendorf AG |

- Erlenmeyer-Kolben 50/100ml
- PCB-Präzisionswaage 0,01 - 200 g KERN& SOHN GmbH
- Filterpapier 7cm Durchmesser
- Glaskapillaren
- Glaspipetten 5 ml und 10ml
- Kieselgel-DC-Platten (Kieselgel G Fertigplatten, 20x20cm)
- Messzylinder 50 ml und 100ml
- Mikroliterpipetten 0-10 μ l/10-100 μ l/100-1000 μ l
- Mikroliterpipettenspitzen 0-10 μ l/10-100 μ l/100-1000 μ l
- Mörser und Pistill
- Nutsche 7cm Durchmesser
- Peleusball/Pipettierhilfe
- Quarzglasküvetten 1 ml
- Spektralphotometer DR 2800 Hach Lange GmbH
- Saugflasche
- Scheidetrichter 250 ml, mit Stativ
- Schüttler
- Spatel
- Trichter
- Trockenschrank
- Wasserstrahlpumpe
- Zentrifuge PerfectSpin Mini peQlab Biotechnologie GmbH

3 Methoden

3.1 Extraktion der Proteine aus dem Pflanzenmaterial

Es wird zwölf Tage in folge ein Topf an belichteten und etiolierten Erbsenpflanzen gesät, sodass zu Beginn der Versuchsreihe 24 Töpfe mit Pflanzen unterschiedlichen Alters zur Verfügung stehen. Dann wird aus jedem Topf Pflanzenmaterial entnommen und dieses, für jeden Topf einzeln, mithilfe eines Mörsers, derselben Menge Wasser wie Pflanzenmaterial und feinem Sand zu Brei zerkleinert. Anschließend wird dieser gefiltert und eine möglichst große Menge abpipettiert.

Becherglas überführt - unter dem Abzug mit Hilfe eines Kaltluftföhnes auf etwa 0,5ml „eingengt“. Für die Extraktion der etiolierten Keimlinge nach gleichem Prinzip werden ebenfalls 5g Pflanzenmaterial gemörsert und analog der zuvor beschriebenen Methode weiterverarbeitet.“

3.4

Dünnschichtchromatographie

ie

Bei der folgenden Methode wurde der Großteil der Facharbeit von Jakob Bollow entnommen, da diese identisch ausgeführt wurde. (Bollow,2014)

„Für die Durchführung der Chromatographie müssen zunächst die Kieselgel-Dünnschichtchromatographie-Platten (Kieselgel-DC-Platten) vorbereitet werden. Dazu legt man diese für 5 Minuten in eine 8-milimolare Ascorbinsäure-Lösung, welche als Oxidationsschutz wirkt. Im Anschluss folgt eine Trocknung über 1 Stunde bei 60°C in einem Trockenschrank. Die eingeeengte Lösung wird im nächsten Schritt mit Glaskapillaren auf die zuvor eingezeichnete Startlinie (2cm vom unteren Plattenrand entfernt) der Kieselgel-DC-Platte aufgetragen und sowohl für belichtete als auch für unbelichtete Keimlinge separat bei simultaner Versuchsanordnung für Sonnenblumen- und Erbsenkeimlinge präpariert. Diese Platten werden nun mit der Startlinie nach unten in die Dünnschichtchromatographie-Trennkammer gestellt. Die Trennkammer wird zuvor mit 50ml Laufmittel- bestehend aus Benzin, Isopropanol und destilliertem Wasser – gefüllt. Das Laufmittel wird mit 100ml Benzin, 11ml Isopropanol und 5 Tropfen destilliertem Wasser angesetzt. Nach dem Verschluss der Kammer beträgt die Laufzeit der Dünnschichtchromatographie etwa eine Stunde, beziehungsweise so lange, bis eine ausreichende Trennstrecke von 15 bis 18 cm erreicht ist. Das Laufmittel wandert auf Grundlage von Kapillarkräften an der Trägerfolie hinauf und trennt die unterschiedlichen Farbstoffe wegen verschiedener Wanderungsgeschwindigkeiten durch deren differierende Adsorptionskräfte zwischen der mobilen Laufmittel-Phase und der stationären Kieselgel-Phase auf. Ist der Vorgang beendet wird die Kieselgel-DC-Platte entnommen und die Laufmittelfront schnellstmöglich eingezeichnet. Die verschiedenen Pigmente lassen sich anhand der sogenannten Rf-Werte (ratio to front, Retentionsfaktoren) bei dem Vergleich zu Literaturwerten identifizieren und abgleichen. Zur Ermittlung der Rf-Werte wird folgende Formel angewendet:

$$\text{Rf-Wert} = \frac{\text{Strecke des Pigmentes von der Startlinie}}{\text{Strecke des Laufmittels von der Startlinie.}}$$
“

3.5

Elution der Pigmente von

der DC-Platte

Bei der folgenden Methode wurde der Großteil der Facharbeit von Jakob Bollow entnommen, da diese identisch ausgeführt wurde. (Bollow, 2014)

„In der weiteren Verarbeitung werden nur die Farbstoffbanden, von denen Extinktionsspektren erstellt werden sollen, von der Trägerfolie abgekratzt. Dabei handelt es sich um die Carotin-Bande, die beiden Chlorophyllbanden (Chlorophyll a + b) sowie die Lutein-Bande. Dafür muss das Kieselgel des entsprechenden Bereiches mit einem Spatel abgekratzt und das abgelöste Pulver in einem 2,2 ml Eppendorfgefäß gesammelt werden. Durch Zugabe von je 2 ml Lösungsmittel werden die Pigmente vom Kieselgel eluiert. Das spezifische Lösungsmittel für die Chlorophyllbanden ist Diethylether, für die Carotinbande das n-Hexan und für die Luteinbande das Ethanol.“

3.6 Aufnahme von Absorptionsspektren pflanzlicher Pigmente

Bei der folgenden Methode wurde der Großteil der Facharbeit von Jakob Bollow entnommen, da diese identisch ausgeführt wurde. (Bollow, 2014)

„Die Eppendorfgefäße werden im Anschluss etwa zehn Minuten mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 10.000 rpm zentrifugiert, damit sich das Kieselgel absetzen und der klare Überstand in je eine 3 ml Quarzglasküvette dekantiert werden kann. Diese drei Überstände werden mit einem Photometer DR 2800 analysiert.

Um die korrekten Spektren zu erhalten, müssen für die zu erwartenden Spektren unterschiedliche Wellenlängenbereiche am Photometer in jeweils 5 nm-Schritten eingestellt werden: Für Chlorophylle 400 - 700 nm, für Lutein und Carotin 390 - 550 nm. Zwischen den Einzelmessungen der Proben sind Eichungen des Photometers mit sogenannten „Null-Lösungen“, bestehend aus den jeweiligen Lösungsmitteln der Pigmente, notwendig. Es wird dabei jeweils nur eine Probe nach der anderen zentrifugiert und deren Überstand aus dem Eppendorfgefäß zur Extinktionsmessung vorbereitet, um zu verhindern, dass sich das abgesetzte Kieselgel nach zu langem Stehen eventuell wieder vom Boden löst und den Überstand trübt. Die klaren Überstände der Pigment-Elution werden in 1mL-Küvetten pipettiert und die Spektren für die entsprechenden nm-Werte gemessen.“

3.7 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes der Keimlinge

Um den gesamten Chlorophyllgehalt von den Keimlingen zu ermitteln, wird jeweils ein belichteter und ein etiolierter Keimling gleichen Alters mit je 40ml 80%igem Aceton und

etwas Seesand in einem Mörser zu einem Brei zerkleinert. Dieser wird in eine 3mL Küvette filtriert und anschließend bei einer Wellenlänge von 652nm im Photometer gemessen. Bei 652nm besitzen beide Chlorophylle ein Absorptionsmaximum. Nun lässt sich mithilfe der Absorptionswerten der Chlorophyllgehalt pro ml Lösung ermitteln, indem man folgende Gleichung auflöst:

$$E_{652} \cdot 0,725 = \frac{mgChlorophyll}{mlLösung}$$

3.8 Gelelektrophorese

Bei der folgenden Methode wurde der Großteil der Facharbeit von Jakob Bollow entnommen, da diese identisch ausgeführt wurde. (Bollow, 2014)

Lösungen	Trenngel	Sammelgel
Wasser	3,15mL	4,55mL
Trenngelpuffer	2,5mL	- - -
Sammelgelpuffer	- - -	1,88mL
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	4,16mL	1,0mL
SDS (10%)	100µL	75µL
Ammoniumperoxidsulfat (10%)	75µL	40µL
TEMED	7,5µL	25µL
Summe	10mL	7,5mL

(Tabelle 1: Bestandteile der Puffer)

„In Tabelle 1 sind die Ansätze für Trenn- und Sammelgel aufgelistet. Das Trenngel wird aus allen angegebenen Bestandteilen zusammenpipettiert und nach Zugabe von TEMED (Tetramethylethyldiamin) - einem Schlüsselkatalysator zur Polymerisation für Acrylamid-Gele - und kurzem Schwenken zwischen eine aus zwei Glasplatten gebildete Kammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Abschluss der Polymerisation und nach Abgießen des Isopropanols sowie anschließender Trocknung erfolgt die Zugabe des zuvor pipettierten Sammelgels, ebenfalls unter Zugabe von TEMED. Vor Verfestigung des Gels wird ein Kamm zur Formung von Taschen von oben zwischen die Glasplatten gesteckt welcher nach der Trocknung wieder entnommen wird. Da das verwendete Acrylamid kanzerogen ist darf das Gießen des Gels nur von einer versierten Fachkraft (in diesem Experiment von Herrn Dr. Schaller) übernommen werden. Alle Homogenate aus Methode 3.1 werden

für jeweils 5 Minuten bei 5.000rpm zentrifugiert. Durch diese Zentrifugation werden Sedimente aus Sand und größeren nicht homogenisierten Zellbestandteilen entfernt. Von diesen Überständen aus wasserlöslichen und membran-gebundene Proteinen werden möglichst die gesamten Überstände in je ein 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert. Die Sedimente werden entsorgt. Danach wird der Überstand erneut Zentrifugiert (15 min. max. Geschwindigkeit) und der Überstand erneut abpipettiert. Der Überstand enthält nun alle gelösten Proteine und das Sediment ungelöste Proteine. Letztere werden mit Wasser auf 120µl aufgefüllt und von dem Überstand wird ebenfalls 120µl genommen. In die Eppendorfgefäße mit den Proteinen (ungelöste Proteine kurz vermischen) werden jeweils 40µl SDS-Probenpuffer pipettiert. Anschließend werden die Proben für 10 Minuten in einem Heizblock auf 100°C erhitzt, wobei die Proteine im SDS-Probenpuffer bei der Hitze denaturieren. Im Anschluss werden diese nochmals kurz zentrifugiert. Von den Proben belichteter und den Proben etiolierter Erbsenkeimlinge werden dann jeweils 10µl in die Gel-Taschen eingefüllt und die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 20mA gestartet. Nach Abschluss der Elektrophorese wird von dem aus der Gelkammer entnommenen Gel das Sammelgel entfernt und verworfen und das Trenngel weiter bearbeitet. Dieses wird mit Färbelösung bedeckt, wobei die Färbung über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde bei leichtem Schütteln auf dem Schüttler einwirken soll, bevor die Färbelösung in die Vorratsflasche zurück dekantiert wird. Das jetzt gefärbte Gel wird im Anschluss kurz in Entfärbelösung gewaschen und wiederholt bis zur Entfärbung mit dem Schüttler in frischen Entfärbelösungen geschüttelt, sodass die Banden sichtbar werden. Prinzip dieser Gelelektrophorese mit dem Trägermaterial Polyacrylamid unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (2) ist die Trennung der durch Aufkochen denaturierten Proteine in Gegenwart des Detergenz „Natriumdodecylsulfat (SDS)“ aufgrund ihres Molekulargewichtes und ihrer Ladung im elektrischen Feld. Durch die Denaturierung und die Zugabe der anionischen Detergenz werden die ursprünglichen Tertiär- oder Quartärstrukturen aufgelöst und die Proteine durch Überdeckung ihrer Eigenladung entsprechend der Länge ihrer Primärstruktur und molekularen Masse (Molmasse in der Einheit Kilodalton kDa) aufgetrennt. Die Reduzierung von Disulfidbrücken und die Auflösung der komplexen Strukturen in den Polypeptidketten wird auch durch niedermolekulare Thiole (z.B. β-Mercaptoethanol) im Probenpuffer unterstützt. Die durch das Detergenz negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld durch die Gelmatrix vom Minuspol zum Pluspol. Bromphenolblau als Farbstoff im Probenpuffer signalisiert dabei den Fortschritt der Elektrophorese. Die über die Elektrophorese aufgetrennten und durch Färbung visualisierten Proteine können anschließend durch den Vergleich mit Markerproteinen (Molekulargewichtsmarker =

Proteinmix bekannter Größen) entsprechend ihrer Größe bzw. molaren Masse abgeschätzt und damit identifiziert werden. Theoretische Prinzipien zur Proteinauftrennung: „Im diskontinuierlichen System passiert die Probe zunächst ein Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite. Der Sammelgelpuffer enthält Chloridionen, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit größer ist als die der Proteinprobe. Der Elektrophoresepuffer hingegen enthält Glycinionen, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit geringer ist. Die Proteine „stapeln“ sich entsprechend ihrer Geschwindigkeit im Feldstärkegradienten zwischen Ionen mit einer niedrigen (Glycinionen) und einer hohen Mobilität (Chloridionen). Dieses Nettoresultat wird als *stacking-Effekt* bezeichnet. Somit wird eine Vortrennung und Aufkonzentrierung erreicht, was sich in einer scharfen Proteinbande äußert. Das Trenngel besitzt eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration sowie einen höheren pH-Wert im Vergleich zum Sammelgel. Beim Einwandern der Proben in das Trenngel tritt eine weitere Verschärfung der Zone ein. Die großen Proteine werden an dieser „Gelgrenze“ zunächst zurückgehalten, sodass die Glycinionen passieren können. Im Puffersystem des Trenngels löst sich dann der Proteinstapel auf und die Proteine werden aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt.“

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich des Phänotyps belichteter und unbelichteter Erbsenpflanzen

Etiolierte und belichtete Erbsen unterscheiden sich sehr stark durch das äußere Erscheinungsbild. Im Gegensatz zu den belichteten Pflanzen, welche kräftig und grün sind und Blätter besitzen, um Photosynthese zu betreiben, sind die etiolierten Keimlinge groß, farblos/matt und weich. Zusätzlich fehlen ihnen Blätter zur Photosynthese, da sie „auf der Suche“ nach Licht sind und so noch keine Photosynthese betreiben könnten.



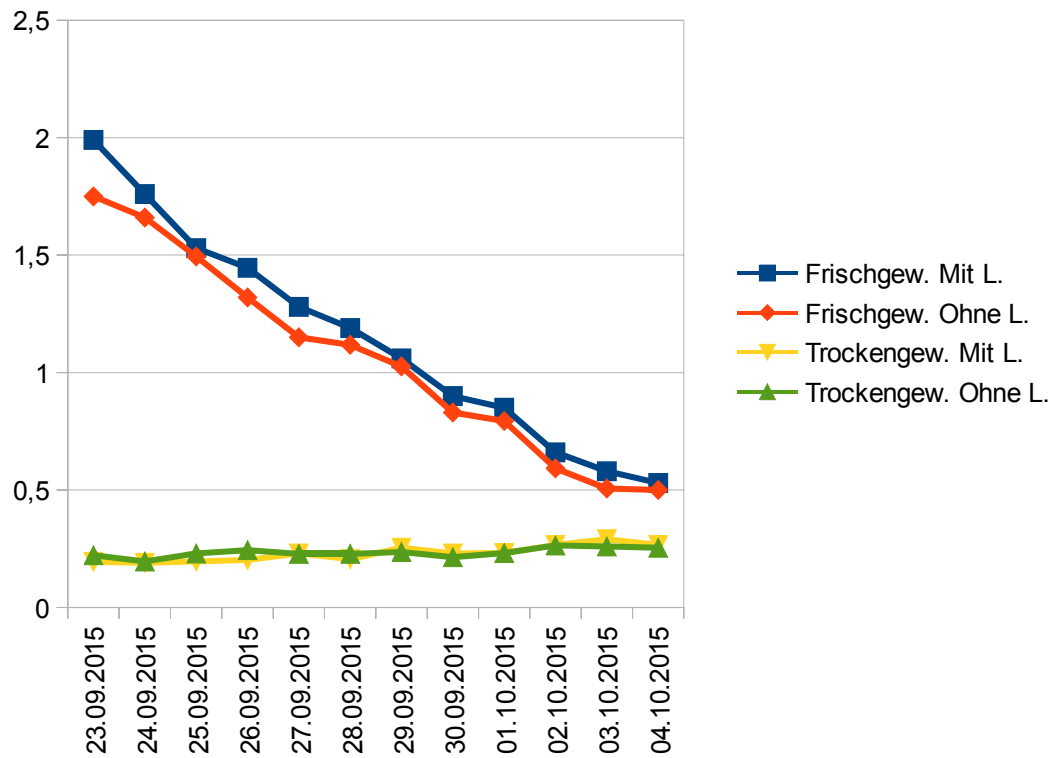
Abb. 1: Phänotypisches Aussehen von belichteten und unbelichteten Erbsenkeimlingen.

Links = etioliert, rechts = belichtet. Die Keimlinge haben ein Alter von jeweils 7 Tagen.

4.2 Frisch- und Trockengewicht der belichteten und unbelichteten Erbsenpflanzen im Vergleich

Die Ergebnisse der Gewichtsbestimmung (etiolierte/belichtete Erbsenpflanzen), vor und nach der Trocknung, ist für die Pflanzen, in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen, in Abb. 2 dargestellt. Dabei wird das Gewicht in Gramm pro Keimling angegeben.

Frisch- und Trockengewicht von etiolierten und belichteten Erbsen



(Abb. 2 Vergleich: Trockengewicht zu Frischgewicht bei etiolierten und belichteten Pflanzen)

Anhand der Grafik lässt sich erkennen, dass die Trockengewichte nahezu identisch sind und sich lediglich geringfügig unterscheiden. Im Gegensatz dazu sind die Frischgewichte der belichteten Pflanzen durchgängig höher als die der etiolierten. Das Trockengewicht gibt das Gewicht der Masse der Pflanzen ohne das Wasser, was zuvor durch die Trocknung entzogen wurde an. Bei dem Frischgewicht noch in die Wertung mit einfließt. Hinzuzufügen ist noch, dass das Trockengewicht aller Altersstufen nahezu gleich bleibt aber das Frischgewicht mit fortlaufendem Alter stetig zunimmt, woraus sich schließen lässt, dass sowohl etiolierte als belichtete Erbsenpflanzen mit zusätzlichem Alter mehr Wasser speichern.

4.3 Dünnschichtchromatographie

(Das folgende Schaubild wurde von Lorenz Bokemeyer erstellt)

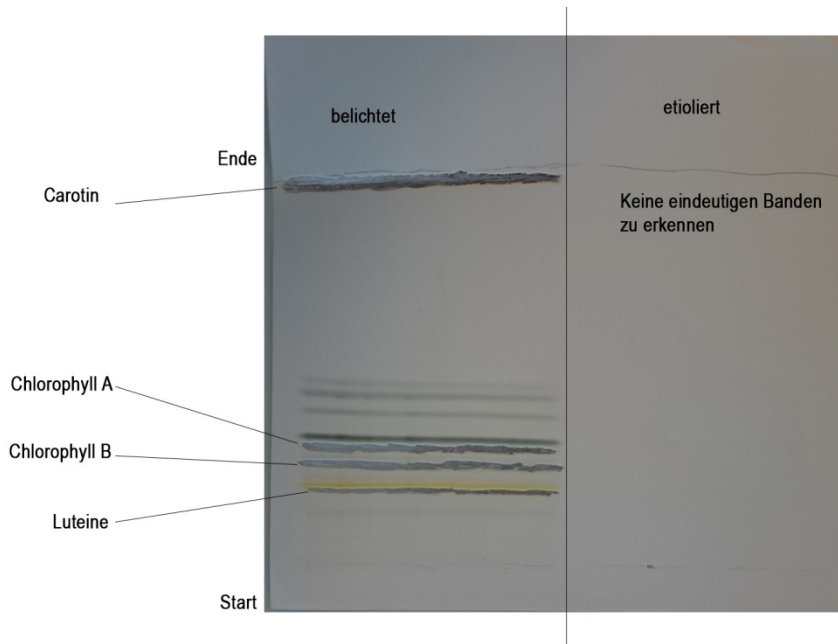


Abb. 3: Kieselgelplatte-DC-Platte: Links = Banden von belichteten Keimlingen
 Rechts = Banden von etiolierten Keimlingen
 erstellt von Lorenz Bokemeyer

Durch die Dünnschichtchromatographie wurden die verschiedenen Pigmente in verschiedene Banden aufgeteilt. Deutlich zu erkennen ist der Unterschied zwischen dem etiolierten Pflanzenextrakt und dem belichteten, denn die Banden der etiolierten Pflanzen sind kaum bis gar nicht sichtbar, doch die der Belichteten sind deutlich und klar zu erkennen. Die Zuordnung der aufgetrennten Pigmente zu den in der Abbildung angegebenen, erfolgt aufgrund der Zuordnung der Rf-Werte zu den unten angegebenen Rf-Werten (s. Abb. 3).

Dazu werden folgende Referenzwerte benötigt:

(Entnommen der Facharbeit von Ariane (Schmücker, 2014))

Rf-Werte

	belichtet	etioliert
Carotine	0,966	0,965
Chlorophyll a	0,303	0,291
Chlorophyll b	0,234	0,220
Lutein	0,186	0,177

4.4 Extinktionsspektren

(Die folgende Grafik wurde von Lorenz Bokemeyer erstellt)

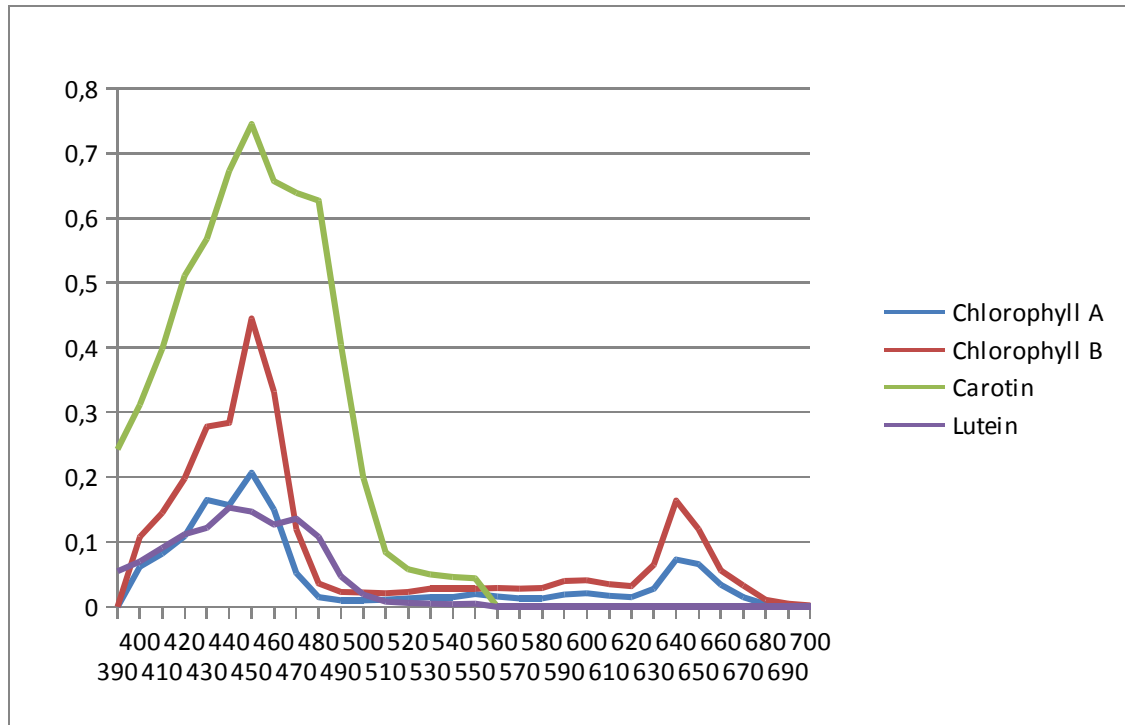


Abb. 4: Lichtabsorption von Pigmenten der vier Proteine bei Wellenlängen von 390 nm bis 700 nm

Diese Grafik wurde von Lorenz Bokemeyer erstellt.

In Abb. 4 sind vier Beispiele von Pigmenten bestimmter Proteine aufgelistet und deren Lichtabsorption bei unterschiedlichen Wellenlängen. Hierbei ist der Grafik zu entnehmen, dass alle vier bei ca. 440-450 nm ein Maximum besitzen. Jedoch ist lediglich bei Chlorophyll A und B auch ein Maximum bei 640 nm vorhanden. Auffällig ist, dass Lutein in dem gemessenen Bereich bis 550 Nanometern am meisten Licht absorbiert und, dass Chlorophyll B bis dahin fast durchgängig die zweit höchsten Werte besitzt. Ab 560 nm dann sind die Werte von Chlorophyll B, welche teilweise doppelt so hoch sind, wie die von Chlorophyll A, am höchsten.

4.5 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes der Keimlinge

In Tabelle 2 ist zu erkennen, dass der Absorptionswert und damit auch die Chlorophyllkonzentration bei den belichteten Keimlingen deutlich höher ist als der der

Etiolierten.

	belichtet	etioliert
Absorptionswert	0,472	0,007
Chlorophyllkonzentration (mg/ml)	0,3422	0,0051

Tabelle 2: Absorptionswert und Chlorophyllkonzentration von belichteten und etiolierten Keimlingen

Damit man nun den Chlorophyllgehalt ermitteln kann, muss man die Konzentration mit dem Volumen (in mL) multiplizieren. Das Ergebnis ist der Chlorophyllgehalt in mg.

4.6 Gelelektrophorese

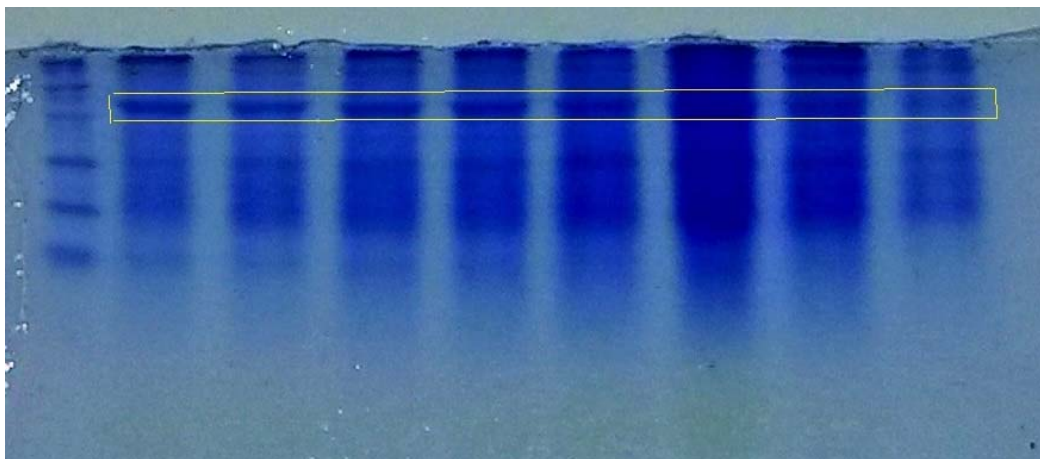


Abb. 5: Gelelektrophorese: ungelöste Proteine von belichteten Pflanzen. Von links nach rechts mit abnehmendem Alter

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Alter (in Tagen)	Marker	12	11	10	9	8	7	6	5

(Tabelle zur Orientierung zu Abb. 5 + 6)

Das Gel (Abb. 5) stellt die ungelösten Proteine der belichteten Pflanzen, aufgeteilt im Hinblick auf die Größe der Proteine, dar. Hierbei sieht man in der ersten Tasche den Marker, welcher als Referenz zur Bestimmung der Proteingröße genutzt wird. Die

Proteinmenge nimmt im Hinblick auf das Alter die ersten drei Tage (ab Tag 5) zu. Danach nimmt sie jedoch konstant leicht ab. In dem eingerahmten Kasten sollte die Rubisco liegen, ein Protein der Photosynthese, und deutlich zu erkennen sein. Hierbei ist auffällig, dass die Rubisco zuerst proportional zu der allg. Proteinmenge ansteigt aber mit zunehmenden Alter gleich bleibt im Gegensatz zu der allg. Menge an Proteinen.

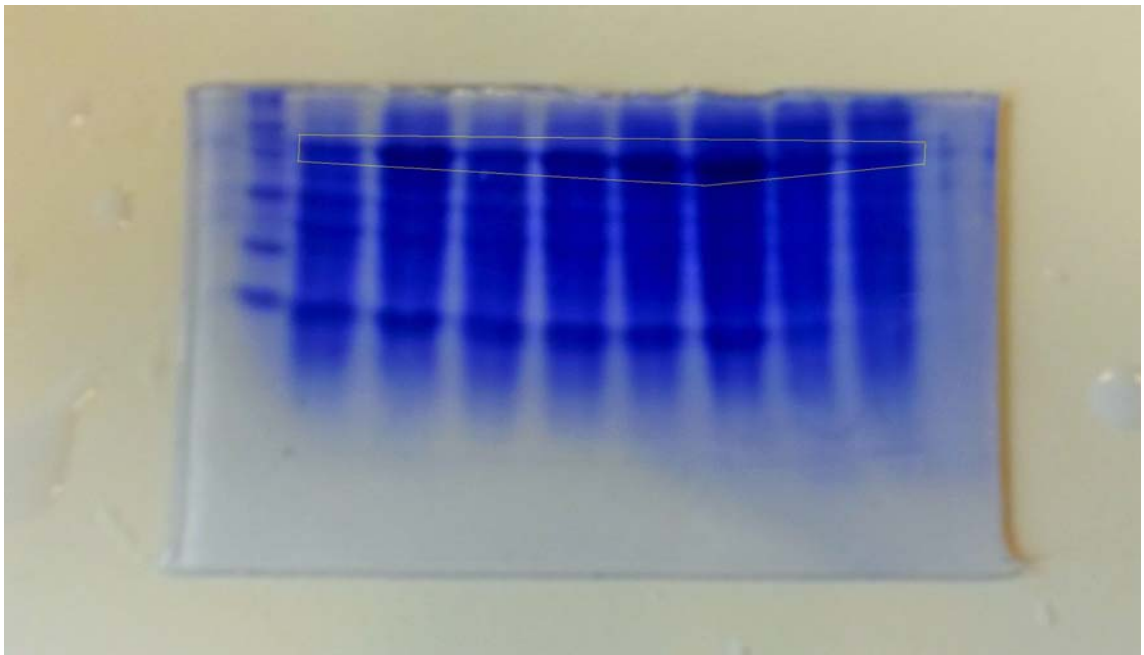


Abb. 6 Gelelektrophorese: gelöste Proteine von belichteten Pflanzen. Von links nach rechts mit abnehmendem Alter

Bei diesem Gel (Abb. 6) sind lediglich wenige Unterschiede zwischen den einzelnen Taschen zu erkennen. Einzig und allein ist eine geringe Abnahme der Proteinkonzentration von Tasche 7 bis 9 auszumachen. Auch hier ist wieder die Rubisco markiert, welche dieselben Merkmale aufweist wie zuvor, denn ihre Anzahl nimmt mit der allg. Proteinmenge zu aber bleibt nach 6 Tagen, bei einer geringen Abnahmen der Proteinmenge, konstant.

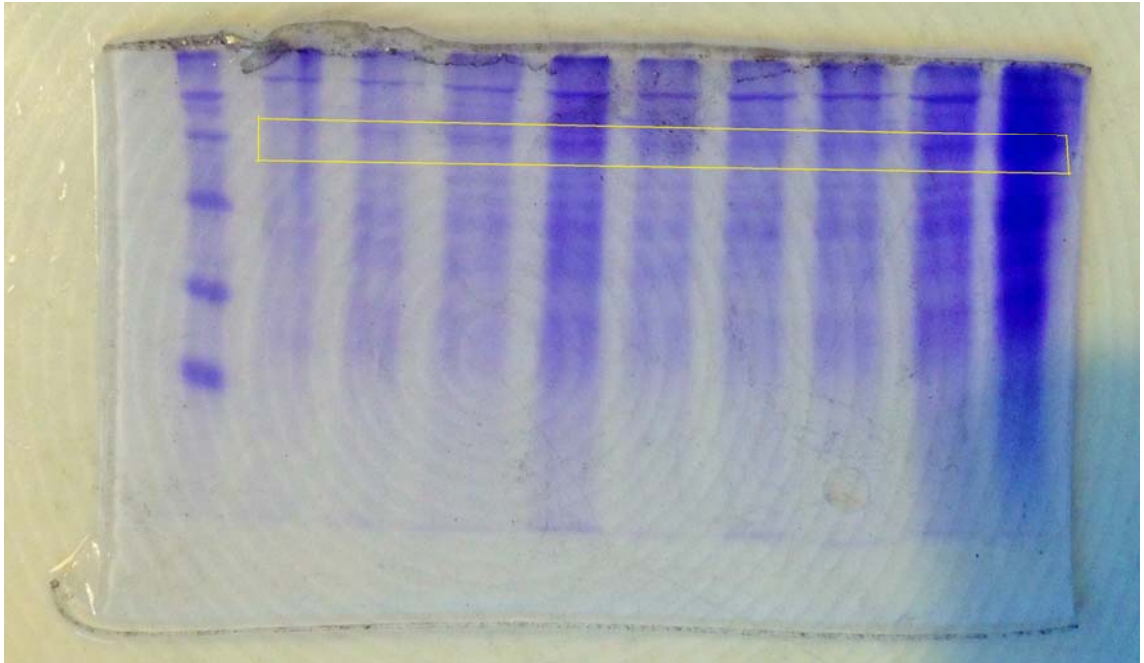


Abb. 7 Gelelektrophorese: ungelöste Proteine von unbelichteten Pflanzen. Von links nach rechts mit abnehmendem Alter

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Alter (in Tagen)	Marker	12	11	10	9	8	7	6	5	4

(Tabelle zu Abb. 7 + 8 zur Orientierung)

Hier (Abb. 7) ist zuerst, mit zunehmenden Alter, eine starke Abnahme der Proteine zu erkennen, danach nur noch geringfügig. Dennoch ist in Tasche 5 eine Steigerung der Konzentration zu erkennen. Auffällig ist auch, dass die Menge der Rubisco (eingerahmter Bereich) weniger gesunken ist als die der gesamten Proteine. Dennoch ist die relative Konzentration deutlich geringer, als die bei den belichteten Proteinen. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass ab dem neunten Tag erneut die allg. Proteinmenge und die der Rubisco steigt jedoch die Produktion nach einem Tag erneut eingestellt worden scheint.

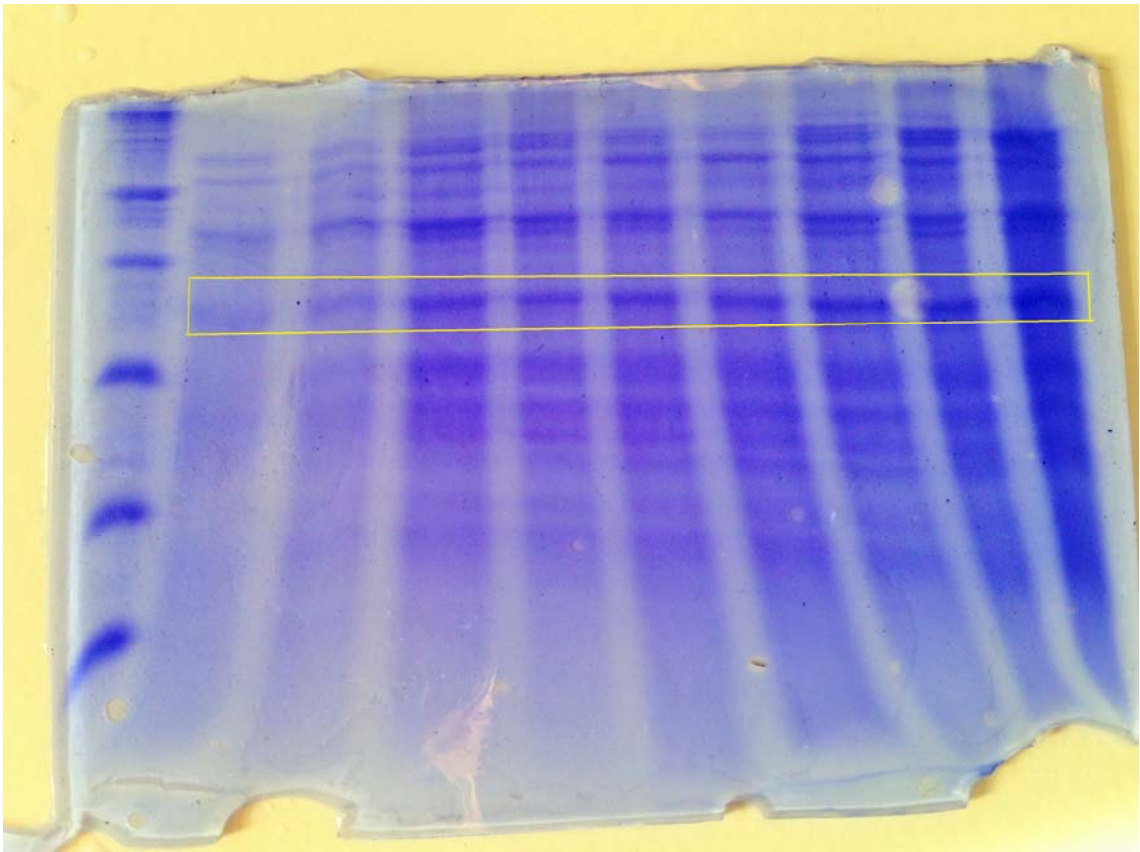


Abb. 8 Gelelektrophorese: gelöste Proteine von unbelichteten Pflanzen. Von links nach rechts mit abnehmendem Alter

Bei dem Schaubild (Abb. 8) ist erkennbar, dass die Proteinmenge der gelösten Proteine bei unbelichteten Erbsenpflanzen stetig gesunken ist. Dabei ist die Menge der Rubisco ebenfalls gesunken, jedoch, von Tasche 10 bis 3, nicht so stark wie die der restlichen Proteine. Danach ist ein deutlicher Rückgang der Menge sichtbar. Außerdem ist zu beachten, dass im Alter von 4 Tagen, relativ zu der allg. Proteinmenge, wenig Rubisco vorhanden ist aber danach bei abnehmender Proteinmenge zunimmt. Ab Tag 10 nimmt die Menge der Rubisco wieder ab, wobei auch die allg. Menge der Proteine weiter abnimmt.

5. Diskussion

Pflanzen wachsen in verschiedenen Regionen der Erde und sind so verschiedenen äußeren Einflüssen ausgesetzt. Diese können sich in Form von unterschiedlichen Temperaturen, hoher bzw. niedriger Feuchtigkeit, oder aber auch in Form von wenig oder gar keiner Belichtung, manifestieren. Durch diese Einflüsse sind die Pflanzen gezwungen sich ihrer Umgebung anzupassen und den Protein- und Energiehaushalt entsprechend zu verändern. So wurde bei diesem Versuch der Extremfall des gänzlichen Ausschlusses von Licht und dessen Auswirkung auf die Proteinmenge der Pflanze untersucht und im Folgenden diskutiert.

Schon beim bloßen Anblick lassen sich wesentliche Unterschiede zwischen belichteten und unbelichteten Erbsenpflanzen festmachen. Diese wesentlichen Unterschiede, wie die der Farbe oder Struktur, lassen sich durch die Abwesenheit von Licht erklären. Zusätzlich ist festzustellen, dass fehlendes Licht zu einer eingeschränkten Proteinexpression innerhalb der Pflanze führt, da Proteine, welche für die Photosynthese benötigt werden, nicht hergestellt werden, wenn die Gegebenheiten, um Photosynthese betreiben zu können, nicht gegeben sind. Dies kann man den Gelen (4.5 Abb. 5-8) gut entnehmen. Hierbei wird der Unterschied der Proteinmenge deutlich, da die Ausprägung der Farbe bei den etiolierten Pflanzen wesentlich geringer ist und damit der Unterschied der Proteinmenge kenntlich gemacht wird. Außerdem ist auch gut zu erkennen, dass der Proteingehalt der etiolierten Pflanzen mit dem Alter abnimmt, da keine neuen Proteine hergestellt werden, aber die Proteine, die in der ausgesäten Erbse waren, verbraucht werden. Im Gegensatz dazu bleibt der Proteingehalt der belichteten Pflanzen gleich. Bei der DC-Platte ist dieser Unterschied noch besser erkennbar, da dort alle Farbstoffe aufgeteilt wurden und durch die Farbpigmente klar zu erkennen sind. Der Kontrast zwischen etiolierten und belichteten Pflanzen ist sehr deutlich sichtbar, weil bei den etiolierten Pflanzen keine oder kaum Banden zu erkennen sind. Im Gegensatz dazu, weisen die belichteten eine sehr kräftige Farbe auf. Die in 4.4 untersuchten Farbstoffe sind auf der DC-Platte nur noch durch die Einkerbung nach dem Abschaben zu erkennen. Es wurden spezifisch diese ausgewählt, weil sie abhängig von der Photosynthese bzw. von den Stärke der Lichteinstrahlung produziert werden. Da die Pflanze jedoch unter Lichtausschluss keine/kaum Pigmente herstellt, lässt sich daraus schließen, dass sie auch keine Photosynthese betreibt. Daraus folgt, dass die Gene für die Synthese der Pigmente nicht eingeschaltet werden oder die m-RNA durch die RNAi Translatiert wird.

In 4.5 wird auch kurz auf die Rubisco hingewiesen, ein Enzym der Photosynthese,

welches aus CO_2 , H_2O und Lichtenergie Zucker herstellt. Sie ist, wie beschrieben, auf Abb. 5-8 markiert. Dort ist klar zu erkennen, dass sie bei beiden Pflanzen vorhanden ist, aber bei den belichteten um einiges stärker konzentriert. Das weist wiederum auf eine Genregulation hin, was bedeuten würde, dass auch die Expression der Rubisco durch die RNAi reguliert sein könnte. Dies soll exemplarisch darstellen, wie stark sich die Konzentrationen unterscheiden. Außerdem ist auch festzustellen, dass sie ein in Wasser lösliches Protein ist und lediglich bei den Gelen der unlöslichen Proteine nachgewiesen wurde, weil sie noch an größeren wasserunlöslichen Proteinen gebunden haben könnte. Eine weitere wichtige Randnotiz ist, dass sie wahrscheinlich das häufigste Enzym darstellt, da sie in jeder Pflanze, die Photosynthese betreibt, im großen Maße vorhanden ist. (www.Spektrum.de)

Jedoch sind auch Abweichungen der Werte, von dem Erwarteten, zu verzeichnen. Das heißt, da sich diese Facharbeit auf die von Jakob Bollow bezieht, konnten Vermutungen und Erwartungen bzw. Referenzwerte ermittelt werden. Diese wichen aber teilweise von denen ab, welche beim erneuten durchführen des Versuches festgehalten wurden. Zum Beispiel sind wesentlich mehr Pigmente der belichteten Pflanzen sichtbar, als bei Jakob Bollow. Ein Grund könnte sein, dass laut Vorschrift die Benzinphase (s. 3.3) mit einem Kaltluftföhn auf 0,5mL eingengt werden sollte, jedoch hier der Extrakt durch Lufttrocknung eingengt und auch ausgetrocknet wurde. Die Überreste wurden zwar mit Benzin auf das bestimmte Volumen aufgefüllt aber es könnte bereits bei dem ein oder anderen Pigment zu einer Oxidation gekommen sein. Dadurch lassen sich auch die Unterschiede der Extinktionsspektren erklären, welche bei einem Vergleich der Grafiken nachgewiesen wurden. (Bollow, 2014)

6. Zusammenfassung

Diese Facharbeit hat sich mit dem Thema der Proteinexpression im Bezug auf das Fehlen von Licht bei Erbsenpflanzen beschäftigt. Dazu wurden etiolierte und belichtete Pflanzen verschiedener Altersstufen angepflanzt und phänotypisch verglichen. Um die Unterschiede der Phänotypen zu erklären, wurden Versuche zum Nachweis der exprimierten Proteine unternommen. Da nun geklärt wurde, dass die Abwesenheit von Licht negative Auswirkung auf die Proteinexpression der Pflanzen hat, wurde eine Möglichkeit, die Grund des Unterschiedes sein könnte, aufgeführt. Diese Möglichkeit, ist die RNA-Interferenz, welche die mRNAs prä-translativ durch den Risc spaltet und abbaut.

7. Literatur

Bollow, Jakob: Facharbeit 2014

<http://www.biosicherheit.de/basisinfo/466.rna-interferenz-rnai-junge-bahnbrechende-entdeckung.html>

(letzter Zugriff: 06.12.2015; letzte Änderung: 05.02.2010)

<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/ribulose-1-5-bisphosphat-carboxylase-oxygenase/9909>

(letzter Zugriff: 06.12.2015; letzte Änderung: 2001)

<https://www.youtube.com/watch?v=cL-lZnpY6Qg>

(letzter Zugriff: 06.12.2015; letzte Änderung: 22.06.2012)

Schmücker, Ariane: Facharbeit 201

Thema: Skoto- und Photomorphogenese bei Sonnenblumenkeimlingen

8.1 Praktikumsvorschrift

Ich erkläre, dass ich diese Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literatur und Quellenverzeichnis aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Um nicht unnötige Proteine herzustellen, welche zu dem Zeitpunkt gar nicht benötigt werden, besitzt eine Pflanze verschiedene Mechanismen. Einer dieser Mechanismen ist die RNA-Interferenz, die ein post-transkriptionaler Mechanismus ist. Essenziell der RNA-Interferenz sind die small interfering RNAs (kurz: siRNA) und micro RNAs (miRNA). Die siRNAs und miRNAs stammen von längeren doppelsträngigen RNA-Sequenzen ab, welche von der Zelle selbst synthetisiert werden und besitzen eine Länge von 21-23 Basenpaaren. Die siRNA wird, im Gegensatz zu der miRNA, welche im Zellkern produziert wird, im Cytoplasma hergestellt. Beide besitzen die identische Aufgabe der Proteinexpression und binden im Cytoplasma an das Enzym Dicer, welches beide in ihre eigentliche Länge zurecht schneidet. Anschließend binden die 21-23 Basenpaare langen Sequenzen an das Argonauten-Protein und teilen sich in Haupt- und Nebenstrang, wobei der Nebenstrang abgebaut wird und der Hauptstrang weiterhin an das Argonautenprotein bindet. Der entstandene Komplex wird als Risc bezeichnet, was genauso viel bedeutet, wie RNA induced silencing complex. Dieser Komplex bindet an eine komplementäre Sequenz der mRNAs. Das Argonautenprotein katalysiert dann die Spaltung der mRNA, welche dann abgebaut wird. Dieser sehr spezifische Vorgang, wird jedoch nur bei Risc's durchgeführt welche eine siRNA besitzen. Risc's, welche aus einer miRNA bestehen können an bis zu hunderten verschiedenen endogene RNA-Sequenzen binden. Hierbei ist aber die miRNA der Katalysator für die Spaltung.