

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	13
1.1 Der Kulturapfel	13
1.1.1 Herkunft	13
1.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung	13
1.2 Das Apfelaroma	15
1.2.1 Biochemische Grundlagen	15
1.2.2 Lipoxygenase-Stoffwechselweg in Pflanzen	15
1.2.3 Abundanz der Lipoxygenase-Gene	18
1.3 Lipoxygenase-Kandidatengen für Aroma	19
1.4 Ziele der Arbeit	20
2 Material und Methoden	23
2.1 Pflanzenmaterial	23
2.2 Benutzte Mikroorganismen	24
2.3 Bestimmung des Fruchtaromas	25
2.4 Molekularbiologische Arbeitstechniken	25
2.4.1 DNA-Isolation	25
2.4.2 RNA-Isolation	26
2.4.3 RNA-Reinigung	26
2.4.4 DNase-Behandlung	27
2.4.5 cDNA-Synthese	27
2.4.6 Überprüfung der Qualität der RNA	27
2.4.7 Agarose-Gelelektrophorese	28
2.4.8 Überprüfung potentieller DNA-Verunreinigung durch PCR mit <i>RNA-Polymerase II</i> -Primern	28
2.4.9 PCR	28
2.4.10 Reinigung von DNA-Material mittels Agarose-Gelelektrophorese und Gelelution	30
2.4.11 Klonierung von PCR-Amplifikaten	30
2.4.12 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese	30
2.4.13 Bakterientransformation	31
2.4.14 Plasmidpreparation	31
2.4.15 Sequenzierung	31

Inhaltsverzeichnis

2.5	Bioinformatische Arbeiten	31
2.5.1	Alignments und Sequenzvergleiche	31
2.5.2	Phylogenetische Bäume	32
2.5.3	Genidentifikation in einer Datenbank (<i>gene mining</i>)	32
2.5.4	Primer	32
2.5.5	Bestimmung des verlässlichsten Referenzgenes für die RT-PCR	33
2.5.6	<i>in silico</i> Charakterisierung von Lipoxygenase-Genen	33
2.5.7	Kartierung (<i>mapping</i>)	34
2.5.8	Assoziationsanalyse	35
2.5.9	Proteinmodellerstellung (<i>structural modeling</i>)	35
2.5.10	Analyse von Proteinmodellen	35
2.5.11	Gratfkbearbeitung	35
2.6	Künstliche Infektion mit Pathogenen	36
2.6.1	Infektion mit Apfelschorf	36
2.6.2	Infektion mit Feuerbrand	37
2.6.3	Infektion von Apfelpflanzen mit Blutläusen	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Bioinformatische Analysen	41
3.1.1	Sequenzanalyse	41
3.1.2	Ermittlung der Genposition im Genom (<i>mapping</i>)	48
3.1.3	Funktionelle Motive und Produktspezifität	50
3.1.4	Subzelluläre Lokalisierung	53
3.2	Klonierung von Lipoxygenase-Genen des Apfels	54
3.3	Expressionsanalyse	56
3.3.1	Lipoxygenase-Expression in verschiedenen Geweben	56
3.3.2	Lipoxygenase-Expression während der Fruchtentwicklung	56
3.3.3	Qualität der Proben-Normalisierung	59
3.3.4	Randnotiz: Lipoxygenase-Expression bei Pathogenbefall	60
3.4	Genetische Assoziation zwischen Aromastoffen und Kandidatengenen	63
3.5	Analyse sortenspezifischer <i>LOX1:Md:1a</i> - Sequenzunterschiede und Strukturmodellierung	66
3.5.1	Kodierende Sequenz	68
3.5.2	Bewertung der Strukturmodellierung	69
3.5.3	Analyse der Strukturmodelle des <i>LOX1:Md:1a</i> -Proteins	70
4	Diskussion	73
4.1	Überblick über die Lipoxygenase-Genfamilie des Apfels	73
4.1.1	Anzahl der Apfel-Lipoxygenase-Gene	73
4.1.2	Verteilung der Lipoxygenase-Gene im Genom des Apfels und die wahrscheinliche Expansion der Genfamilie	73
4.1.3	Biochemische Funktion der Lipoxygenasen	75
4.1.4	Verlässlichkeit von <i>in silico</i> -Ergebnissen	75

4.2	<i>MdLOX1a</i> - das wichtigste Lipoxygenase-Fruktaromagen des Apfels . . .	76
4.2.1	Kandidatengenexpression im Klimakterium	76
4.2.2	Hinweise auf Funktionen in mehreren Stoffwechselwegen	77
4.2.3	Sortenspezifische Expressionsunterschiede	78
4.2.4	Assoziationsanalyse	79
4.3	Schlussfolgerung	81
4.4	Weiterführende Arbeiten	81
4.4.1	LOX-abhängige Hexanalproduktion und Pathogene	82
4.4.2	Entwicklungsphysiologische Funktionen	82
5	Zusammenfassung	85
6	Anhang	87
6.1	Zusätzliche Abbildungen	87
6.2	Zusätzliche Tabellen	90
6.3	Lösungen und Medien	99
6.3.1	Medien	99
6.3.2	Lösungen und Puffer	99
	Literaturverzeichnis	112
	Liste der Veröffentlichungen	113
	Danksagung	115
	Lebenslauf	117
	Erklärungen	119