

**Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von
Suppressormutanten für *Transcriptional Gene Silencing*
in *Arabidopsis thaliana***



Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem

**Fachbereich Biochemie/Biotechnologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Ingo Hofmann
geb. am 21.07.1970 in Halle (Saale)

Gutachter: 1. Prof. Dr. Gunter Reuter
 2. Prof. Dr. Claus Wasternack
 3. PD Dr. Ortrun Mittelsten Scheid

Halle (Saale), den 03.11.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000008467
[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008467>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Mechanismen der Inaktivierung	2
1.2	Biologische Funktion von TGS	3
1.3	DNA-Methylierung bei TGS	4
1.4	Einfluß von Transgenstruktur und Insertionsort auf TGS	6
1.5	Modellsysteme für TGS.....	7
1.6	Chromatinkomponenten mit Funktion bei TGS	11
1.7	Gegenstand der Arbeit	12
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Verwendete Materialien.....	14
2.1.1	Chemikalien, Lösungsmittel, Enzyme und Oligonukleotide	14
2.1.2	Pflanzenmaterial	14
2.1.3	Medien für die Kultur der Pflanzen	15
2.1.4	Mikroorganismen.....	15
2.1.5	Bakterielle Nährmedien	15
2.1.6	Vektoren.....	16
2.2	Angewandte Methoden	17
2.2.1	Isolation pflanzlicher Gesamt-DNA	17
2.2.2	Isolation von Plasmid-DNA.....	17
2.2.3	Isolation von RNA.....	18
2.2.4	Erzeugung, Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten	18
2.2.5	RT-PCR-Analysen	19
2.2.6	Agarosegelelektrophorese.....	19
2.2.7	<i>Nuclear Run-On</i> Transkription	20
2.2.8	Hybridisierungsexperimente.....	21
2.2.9	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	22
2.2.10	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
2.2.11	Anzucht des Pflanzenmaterials	23
2.2.12	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.2.13	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
2.2.14	Mutagenese von <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.2.15	Kartierung der Mutationsorte.....	25
2.2.16	Nachweis von Luciferase, β -Glucuronidase und GFP.....	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Etablierung eines transgenen Testsystems für TGS	27
3.1.1	Herstellung der T-DNA-Konstrukte zur Induktion von TGS	27
3.1.2	Transformation und Selektion transgener Pflanzen.....	27

3.1.3	Untersuchung zur Expression der transgenen Reporter	28
3.1.3.1	Transgenexpression der Luciferaselinien	28
3.1.3.2	Transgenexpression der GUS-Linien	29
3.1.3.3	Transgenexpression der <i>GFP</i> -Linien	30
3.1.3.4	Auswahl geeigneter Linien für die Etablierung eines Testsystems.....	30
3.1.4	Charakterisierung der T-DNA-Insertionen der Luciferaselinien	32
3.1.5	Transkriptionsaktivität und Transkriptakkumulation.....	34
3.1.6	Reaktivierung der Transgenexpression	36
3.1.7	DNA-Methylierungsstatus der Expressionskassetten	37
3.2	Induktion und Selektion von Suppressormutanten für TGS	39
3.2.1	Mutagenese.....	39
3.2.2	Mutantenselektion	40
3.3	Charakterisierung der isolierten Suppressormutanten für TGS	41
3.3.1	Transgenexpression in den selektierten Mutanten	41
3.3.2	Kontrolle der T-DNA-Insertionen in den Mutantenlinien	43
3.3.3	DNA-Methylierungsstatus der Expressionskassetten in den Mutanten	44
3.3.4	Segregation der Mutantenphänotypen nach Kreuzung	44
3.4	Kartierung der Mutationsorte	53
3.5	Identifizierung der Mutationsorte der allelen Mutanten 9/2/5 und 12/4/4	55
3.6	Komplementationsanalyse der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4.....	58
3.6.1	Expression von <i>TTG2</i> unter Kontrolle des endogenen Promotors.....	58
3.6.2	Untersuchung der Allelie der Mutanten 9/2/5, 12/4/4 und <i>ttg2-1</i>	60
3.7	Identifizierung des Mutationsortes der Mutante 6/8/1	60
3.8	Einfluß von <i>AtSUVH2</i> auf TGS	61
4	Diskussion	63
4.1	Etablierung eines neuen Testsystems zur genetischen Analyse von TGS	63
4.2	Isolation und Charakterisierung neuer Suppressormutanten für TGS	71
4.3	Kartierung der Mutationsorte der isolierten Mutanten.....	74
4.4	Untersuchungen an den Mutanten 9/2/5 und 12/4/4	75
4.5	Identifizierung des Mutationsortes der Mutante 6/8/1	79
4.6	Der Einfluß von <i>AtSUVH2</i> auf TGS	80
5	Zusammenfassung.....	82
6	Literatur.....	84
7	Anhang	96
7.1	Herstellung der Expressionskassetten	96
7.2	Modifizierung des Vektors pGPTV-KAN	96
7.3	Herstellung der T-DNA-Konstrukte.....	97
7.4	Verwendete molekulare Marker	100
7.5	Primer für Klonierung und Sequenzierung	102

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin-Nukleotid	min	Minuten
Abb.	Abbildung	MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonat
Amp ^r	Ampicillinresistenz	mRNA	<i>messenger</i> RNA
ATPase	Adenosintriphosphatase	MS	Murashige und Skoog
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>	M _(x)	Generation nach Mutagenese
BAP	Benzylaminopurin	N	Aminosäure Asparagin
BAR	Basta-Resistenz; Phosphinothricinacetyltransferase	N	eines der Nucleotide A, C oder T
bp	Basenpaar	<i>NPT II</i>	Neomycinphosphotransferase
bzw.	beziehungsweise	N-terminal	Amino-Terminus eines Proteins
C	Cytosin-Nukleotid	OD ₅₅₀	optische Dichte bei 550 nm
°C	Grad Celsius	p	Phosphat
ca.	zirka	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>	PEV	Positionseffektvariegation
CAPS	<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i>	pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>	Poly-A	Polyadenylierung
CHS	Chalconsynthase	PTGS	<i>Post Transcriptional Gene Silencing</i>
Ci	Curie	Q	Aminosäure Glutamin
CTP	Cytidintriphosphat	R	Aminosäure Arginin
dATP	2'-Desoxy-Adenosintriphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
d.h.	das heißt	RNase	Ribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid	rRNA	ribosomale RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Upm	Umdrehungen pro Minute
DNase	Desoxyribonuklease	RT	<i>Reverse</i> Transkription
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraacetat	s.	siehe
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α	SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
EMS	Ethylmethansulfonat	siRNA	<i>small interfering</i> RNA
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere	SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>
F _(x)	Generation nach Kreuzung (Filialgeneration)	SSLP	<i>Simple Sequence Length Polymorphism</i>
g	Gravitationskonstante	SUVH _(x)	<i>SU(VAR)3-9</i> -Homolog
G	Guanin-Nukleotid	T	Aminosäure Threonin
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	T	Thymin-Nukleotid
GTP	Guanosintriphosphat	Tab.	Tabelle
GUS	β -Glucuronidase	T-DNA	Transfer-DNA
h	Stunden	TGS	<i>Transcriptional Gene Silencing</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonat	TMV	Tabakmosaikvirus
HPT	Hygromycinphosphotransferase	Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
H3K9	Histon H3 Lysin 9 (Methylierung)	T _(x)	Generation nach Transformation
i.a.	im allgemeinen	U	<i>Units</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid	u.a.	unter anderem
K	Aminosäure Lysin	UTP	Uridintriphosphat
Kan ^r	Kanamycinresistenz	UV	ultraviolett
Kap.	Kapitel	W	Aminosäure Tryptophan
kb	Kilobasenpaare	w/v	Masse je Volumen
L	<i>Layer</i> ; Zellschicht	WT	Wildtyp
<i>LacZ</i> α	α -Untereinheit der β -Galactosidase	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid
LB	Luria Bertani	X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronid
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>	Y	Aminosäure Tyrosin
LUC	Luciferase	z.B.	zum Beispiel
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonat	z.T.	zum Teil
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>		