

**Molekulargenetische und funktionelle Analyse von
SUVH2, einem SU(VAR)3-9 homologen Protein in
*Arabidopsis thaliana***



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem

Fachbereich Biologie
Der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Kathrin Naumann
geb. am 12.11.1970 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. G. Reuter
2. Prof. Humbeck
3. Prof. Sonnewald

verteidigt am 23.06.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010456

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010456>]

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
A.th.	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat-Na ₂ -Salz
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BAP	Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
cDNA	doppelsträngige DNA- Kopie der mRNA
C-terminal	Carboxy-Terminus eines Proteins
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat- Na ₂ -Salz
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin- Tetraessigsäure- Na ₂ -Salz
EMS	Ethylmethansulfonat
et al.	et alii, und andere
GFP	Green Fluorescent Protein
GUS	<i>β-Glucuronidase</i>
HMTase	Histon-Methyltransferase
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
LUC	Luziferase
mRNA	"messenger- RNA ", Boten- RNA
Mb	Megabasenpaare
MCS	Multiple Cloning Site
M&S	Murashige und Skoog
NOS	Nopalinsynthetase
NPT II	<i>Neomycinphosphotransferase</i>
N-terminal	Amino-Terminus eines Proteins
OD	Optische Dichte

ORF	" <i>Open Reading Frame</i> ", offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEV	Positionseffekt- Variegation
PR- Protein	<i>pathogenesis- related protein</i> , Pathogen- induziertes Protein
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
rpm	Umdrehung pro min
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SAC	SET-Domänen assoziierte Cystein reiche Region
SET- Domäne	gemeinsame Domäne der Proteine <u>S</u> U(VAR)3-9, <u>E</u> (z) und <u>T</u> RITHORAX (<i>Drosophila melanogaster</i>)
ss	single strang, Einzelstrang
SSC	NaCl- Natriumcitrat- Puffer
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethyldiamin
TGS	<i>Transcriptional Gene Silencing</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
usw.	und so weiter
WT	Wildtyp
X- Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-D- Galaktosid
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronid
z.Bsp.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Identifizierungssysteme für <i>TGS</i> -Suppressoren in <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
1.2	DNA modifizierende Gene mit Einfluss auf den <i>TGS</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
1.3	Histon modifizierende Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
1.4	SET-Domänen Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.5	Die Rolle der Histon-Modifikationen in Eukaryoten	8
1.6	Ziele der Arbeit	11
2.	Material und Methoden	12
2.1	Bakterienstämme / Bakterienanzucht und –behandlung	12
2.1.1	verwendete Bakterien	12
2.1.2	verwendete cDNA-Bibliotheken	12
2.1.3	Anzucht von <i>E. coli</i>	12
2.1.4	Präparation und Transformation kompetenter Agrobakterien	13
2.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2.2.1	Material und Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2.2.2	Kulturmedien für die Anzucht und Haltung der Pflanzen	14
2.2.3	Transformation in <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
2.2.4	EMS- Mutagenese von Saatgut	15
2.2.5	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
2.3	Plasmide und Konstrukte	16
2.3.1	verwendete Expressionsvektoren	16
2.3.2	verwendete Konstrukte	17
2.3.3	Konstruktion des binären Vektors pBI 1.4tr	18
2.4	Molekularbiologische Arbeiten mit DNA	18
2.4.1	Isolation von Plasmid- DNA nach alkalischer Methode (Birnboim and Doly, 1979)	18
2.4.2	Präparative Plasmidisolierung	19
2.4.3	Ligation	19
2.4.4	DNA Isolation <i>Arabidopsis</i>	20
2.4.5	Southern-Analyse	20
2.4.6	Transienter Expressionssay	21
2.4.7	DNA-Sequenzierung	22

2.5	PCR und DNA-Analysemethoden	22
2.5.1	DNA Amplifikation mittels PCR	22
2.5.2	TAIL- PCR	23
2.5.3	Inverse PCR	24
2.6	Molekulargenetische Arbeiten mit RNA	24
2.6.1	Isolation von Gesamt- RNA	24
2.6.2	RT-PCR	25
2.6.3	Quantitative <i>Real Time</i> PCR	25
2.7.	Affymetrix cDNA Expressionschip	26
2.8	Bioinformatik	26
3.	Ergebnisse	29
3.1	Identifizierung und Analyse pflanzlicher SET- Domänen Proteine	29
3.1.1	Charakterisierung des Proteins OsSET1 aus <i>Oryza sativa japonica</i>	29
3.1.2	Molekulare Analyse des Gens <i>SUVH2</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
3.2.	Charakterisierung transgener Linien zur funktionellen Analyse von SUVH 2	35
3.2.1	Überexpression von SET-Domänen Genen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
3.2.2.	Analyse der transgenen Linien 35S*:: <i>mycSUVH2</i>	35
3.2.2.1	Charakterisierung der Linien 35S*:: <i>mycSUVH2</i>	35
3.2.2.2	Der Einfluss von <i>SUVH2</i> auf die Expression der <i>SUVH</i> -Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
3.2.3	Dosis abhängiger Effekt von SUVH2	41
3.2.3.1	Analyse der <i>svh2</i> SALK-Mutante und der transgenen Linien 35S*:: <i>SUVH2as</i>	41
3.2.3.2	Der Einfluss von <i>SUVH2</i> auf die Transkription von <i>MET1</i> , <i>CMT3</i> und <i>DDM1</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
3.3.	Einfluss von SUVH2 auf die genomweite Genexpression	46
3.3.1	Einfluss von SUVH2 auf die Expression von SET-Domänen Gene	46
3.3.2	Änderung der Expression von transponiblen Elementen	48
3.3.2.1	Der Einfluss von <i>SUVH2</i> auf die Expression des Retrotransposons <i>ATHILA</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
3.3.2.2	Einfluss von SUVH2 auf die Expression von verschiedenen Transposons	50
3.3.3	Einfluss von SUVH2 auf die Expression pflanzlicher Resistenz (R)-Gene	52

3.4	Einfluss von <i>SUVH2</i> auf <i>Transcriptional Gene Silencing</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
3.4.1	Dosis abhängiger Effekt von <i>SUVH2</i> auf das <i>Silencing</i> von LUC	55
3.4.1.1	Die Überexpression von <i>SUVH2</i> verstärkt das <i>Silencing</i> des Reportergens <i>LUZIFERASE (LUC)</i>	55
3.4.1.2	Die Reduktion des endogenen <i>SUVH2</i> verstärkt die Aktivität des Reporters <i>LUZIFERASE</i>	57
3.4.2	Einfluss der <i>ddm1-2</i> Mutante auf die Ausprägung des "mini-Pflanzen" Phänotyps	59
3.5	Molekulare und funktionelle Analyse der Domänen in <i>SUVH2</i>	61
3.6	Einfluss des Potyvirus <i>TuMV</i> auf die Expression der <i>SUVH</i> -Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
3.6.1	Induktion von <i>SUVH2</i> bei Virus-Infektion im Wildtyp	64
3.6.2	Induktion von <i>SUVH4</i> bei Virus-Infektion in der SALK Linie <i>suvh2</i>	67
4.	Diskussion	70
4.1	Charakterisierung von SU(VAR)3-9 homologen Proteinen in Pflanzen	70
4.2	Der Einfluss von <i>SUVH</i> -Proteinen auf die Ausprägung von Heterochromatin	71
4.3	<i>SUVH2</i> -abhängige Änderungen der Expression von SET-Domänen Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
4.4	Das <i>Silencing</i> von Retrotransposons in <i>Arabidopsis</i>	75
4.5.	Dosisabhängiger Effekt von <i>SUVH2</i> auf <i>Transgene Silencing</i>	78
4.6	Charakterisierung von SU(VAR)3-9 homologen Proteine	79
4.7	Einfluss von <i>SUVH2</i> auf die Expression der Resistenzgene	81
4.8	Interaktion zwischen <i>SUVH2</i> und dem Virus <i>TuMV</i>	83
4.9	Zusammenfassung	85
5.	Anhang	87
5.1	Primerliste	87
5.2.	Sequenzen	90
5.2.1	Sequenz und Proteindomänen von OsSET1	90
5.2.2	Sequenz und Proteindomänen von At <i>SUVH2</i>	91
5.3.	Liste der Insertionsorte für die Linien 35S*:: <i>mycSUVH2</i>	91
5.4	Reduzierte Transposon Expression in der Linie 35S*:: <i>mycSUVH2#5</i>	92
5.5	Mutanten im <i>mycSUVH2</i>	93

5.6	Expressionveränderungen in <i>35S*::mycSUVH2#5</i> Überexpressionspflanzen	94
5.6.1	Zusammenfassung der reprimierten Gene in <i>35S*::mycSUVH2#5</i>	94
5.6.2	Änderung der Expression einiger Transposons	94
5.6.3	Änderung der Expression einiger an der Pathogenantwort beteiligter Gene	95
6.	Literatur	96