

Vorlesung

Molekularbiologie der Pflanze

FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie



Molekularbiologie der Pflanzen: Warum ?

- **Das Genom einer Pflanze:**
 - im Dez. 2000 wurde das erste Pflanzengenom vollständig abgeschlossen;
- **Grundlegende Techniken:**
 - Transformationen, Reportergene, Selektionsverfahren etc. etc.
- **Anwendung:**
 - Z.B. Mutantenbanken, Mikroarrays etc.
- **Beispiele:**
 - z.B. Blütenentwicklung



Molekularbiologie der Pflanzen: Warum ?

- **Grundlagenforschung:**
 - Wie ist ein Genom aufgebaut ?
 - Wie unterscheiden sich Genome von Tieren und Pflanzen ?
- **Anwendungsrelevante Gründe:**
 - molekulare Züchtung → viel gezielter;
 - Ernährung → Quantität und „ORT“;
 - Qualität → Inhaltsstoffe „Golden Rice“;
 - Umweltschutz → weniger Spritzmittel;
 - neue Rohstoffe → Alternativen zu fossilen Energieträgern;
- Geld



Grundlagenforschung

Wie werden Gene reguliert? („Bin ich eine Blattzelle oder was?“)

- 30 – 45 % der Pflanzengene sind überhaupt nicht bekannt
- manche Pflanzen haben ein Gen, manche 20 – warum?
- in Pflanzenzellen gibt es drei Genome: Chloroplasten-Genom, Pflanzen-Genom und Mitochondrien-Genom

Anwendungsrelevante Gründe

„Ernährung → Quantität und ORT“

Ort: ... wo man Pflanzen züchten kann, z.B. Tropenpflanzen bei uns oder andersrum, nicht-Halophyten in Salzgebieten, Temperatur, Trockenheit und andere Anpassungen

„Qualität → Inhaltsstoffe, „Golden Rice““

Golden Rice: Sorte, die Vitamin A-Vorstufen überexprimiert (sieht dadurch gelb aus); in einigen Gegenden der Erde haben die Menschen täglich nur Reis zur Verfügung, dieser enthält kein/kaum (bin mir nicht sicher) Vitamin A. Erwachsenen schadet dies nicht, doch Kinder werden durch fehlendes Vitamin A blind → Golden Rice schafft Abhilfe

„Umweltschutz → weniger Spritzmittel“

Durch Bestrahlung und Auslese wurden bei „Hochleistungskulturpflanzen“ auch Resistenzgene wegmutagenisiert → diese sind extrem empfindlich, man benötigt extrem viel Spritzmittel

Molekularbiologie der Pflanzen



Arabidopsis thaliana

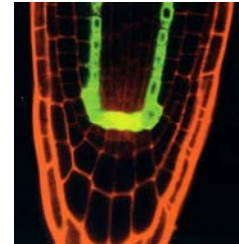
„Ackerschmalwand“

- verbreitetes Ackerunkraut;
- schon seit 70 - 80 Jahren intensiv anatomisch und physiologisch untersucht;
→ viele bekannte Ökotypen;
- hat nur 5 Chromosomen;
- sehr kleines Genom
(125 Mbp = 125.000.000 bp);
- produziert sehr viele Samen;
- kurze Generationszeit (6 Wochen);
- ist sehr klein
(Rosette ca. 5 - 7 cm);



Molekularbiologie an Arabidopsis

- Klonieren und Sequenzieren, d.h. Identifizieren von Genen, seit Mitte der 70er Jahre = seit der Entdeckung der Restriktionsenzyme und Ligasen;
- Transformation, d.h. Verändern des Genpools, seit Mitte der 80er Jahre = nach der Herstellung synthetischer Ti-Plasmide;
- Initiierung des Genomprojektes, 1989 mit dem Ziel, das Genom bis zum Jahr 2005 zu sequenzieren;
- Abschluß des Genomprojektes, Dezember 2000;
- Initiierung des Proteom/Functional Genomic-Projektes, 2001 mit dem Ziel im Jahr 2010 die Funktion aller Genprodukte zu verstehen;



Molekularbiologie an Arabidopsis

Arabidopsis ist heute:

- das am besten verstandene molekulare Modellsystem Höherer Eukaryonten;

Gründe:

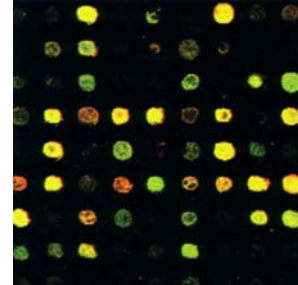
- Sehr einfache Transformationstechniken (Agrobakterien);
- preisgünstige Anzucht und Vermehrung;
- DNA-, RNA-, Samen-, Mutanten-Banken wurden frühzeitig organisiert und stehen der gesamten Wissenschaft zur Verfügung;
- Einfache Mutagenese und Identifizierung der betroffenen Gene;



Molekularbiologie an Arabidopsis

Die Verfügbarkeit von nahezu unbegrenzten Mutantenzahlen macht Arabidopsis zur vielzelligen, Eukaryontischen ***Escherichia coli***, denn:

- nur über Mutanten lassen sich die Funktionen aller Gene identifizieren;
- nur über Mutanten lassen sich Signaltransduktionskaskaden studieren;
- nur über Mutanten läßt sich die physiologische Relevanz eines Genproduktes charakterisieren;
- nur über Mutanten lassen sich die einzelnen Mitglieder von Multigenfamilien in ihrer Funktion analysieren;



Das Arabidopsis-Genomprojekt

Begonnen 1990

	Sequenziert	Kosten
• 1997	20 %	30 Mio US \$
• 1998	50 %	50 Mio US \$
• 1999	75 %	70 Mio US \$
• 2000	100 %	100 Mio US \$

Beendet 2000



Wie wurde Arabidopsis-Genomprojekt organisiert und was haben wir gelernt?

Sequenziert wurden in erster Linie BACs
(= bacterial artificial chromosomes)

Das sind spezielle *E. coli* Plasmide mit großen Inserts
(50.000 bis 100.000 bp)

zuerst sortiert über:

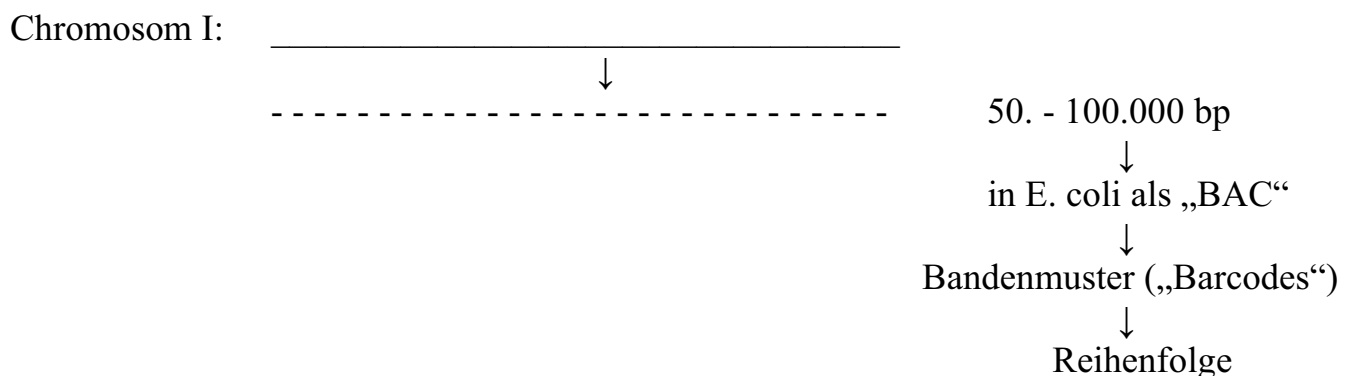
- restriction fragment fingerprinting,
- über Hybridisierung mit bekannten Fragmenten,
- und über PCR-Analysen;

außerdem wurden:

- außerdem wurden von 47.788 BACs die Enden sequenziert;



Identifizierung von Genfunktionen über Ausschalten der Gene in Mutanten



Was tun, wenn nicht alle BACs sich überlappen?

Suchen! Zur Not künstlich per PCR DNA-Abschnitte amplifizieren.

Wie wurde Arabidopsis-Genomprojekt organisiert und was haben wir gelernt?

Mit diesem Wissen wurden 10 Contigs erstellt, die aus 1.569 BACs, einigen kleineren Phagen-Klonen und aus 22 über PCR amplifizierten Fragmenten bestanden;



Wie wurde Arabidopsis-Genomprojekt organisiert und was haben wir gelernt?

Die Sequenzierung dieser Fragmente erfolgte in 20 Labors weltweit;

Es wurden insgesamt 470.000.000 bp sequenziert;

Die erhaltene Genauigkeit beträgt 99,999%, d.h. im Schnitt kann jede 100.000-ste Base falsch sein;

D.h. maximal 1.200 Fehler in dem sequenzierten Genom von 125.000.000 bp;



Andere Genome zum Vergleich

Bohne:	14.000.000.000 bp
Mais:	4.000.000.000 bp
Mensch:	3.000.000.000 bp
Arabidopsis:	125.000.000 bp
Bäckerhefe:	30.000.000 bp
E. coli:	3.000.000 bp



Aufbau des Arabidopsis Genoms

Chromosom 1:	29.105.111 bp	6.543 Gene
Chromosom 2:	19.646.945 bp	4.036 Gene
Chromosom 3:	23.172.617 bp	5.220 Gene
Chromosom 4:	17.549.867 bp	3.825 Gene
Chromosom 5:	25.953.409 bp	5.874 Gene
Summe:	115.409.949 bp	25.498 Gene

+ ca. 10 Mio. bp  Gesamtgröße: 125 Mio. bp

- für fehlende repetitive Sequenzen;
- für Centromerstrukturen und ebenfalls repetitive rDNA-Bereiche;



Die fehlenden 10 Millionen Basenpaare werden nicht mehr sequenziert werden, da es sich dabei um repetitive Bereiche handelt:

- Organismen mit großem Genom haben viele solcher Bereiche
- man kennt das Muster der Überlappung nicht → man weiß nicht, wie oft es sich wiederholt

rDNA (DNA, die für Ribosomen codiert) sind auch voller repetitiver Sequenzen:

- normalerweise wird eine mRNA tausendfach translatiert → eine mRNA, tausende Proteine
- eine rDNA ist ein Ribosomenteil → eine rRNA, ein Ribosomenteil → diese Struktur-RNAs liegen in großer Menge im Genom vor

Was wurde gefunden ?

- tRNAs für alle 61 Codons (64 minus TGA, TAG, TAA)

- Davon
- 589 cytoplasmatische tRNAs
 - 27, die ihren Ursprung in Organellen hatten
 - 13 Pseudogene

- RNAs (U_1 - U_6) des Splicosomes
- regulatorische RNAs (micro RNAs etc.)

- **GENE**

- 69% aufgrund von Ähnlichkeiten zugeordnet
- Nur 9% aller Gene sind bisher experimentell charakterisiert
- ca. 30% sind völlig unbekannt!

Wie erkennt man eigentlich ein Gen ???



Pseudogene: Gene, die nicht zu einem „richtigen“ Produkt führen (durch Mutationen wie Insertionen, Deletionen etc.) oder deren Promotor nicht aktiv ist

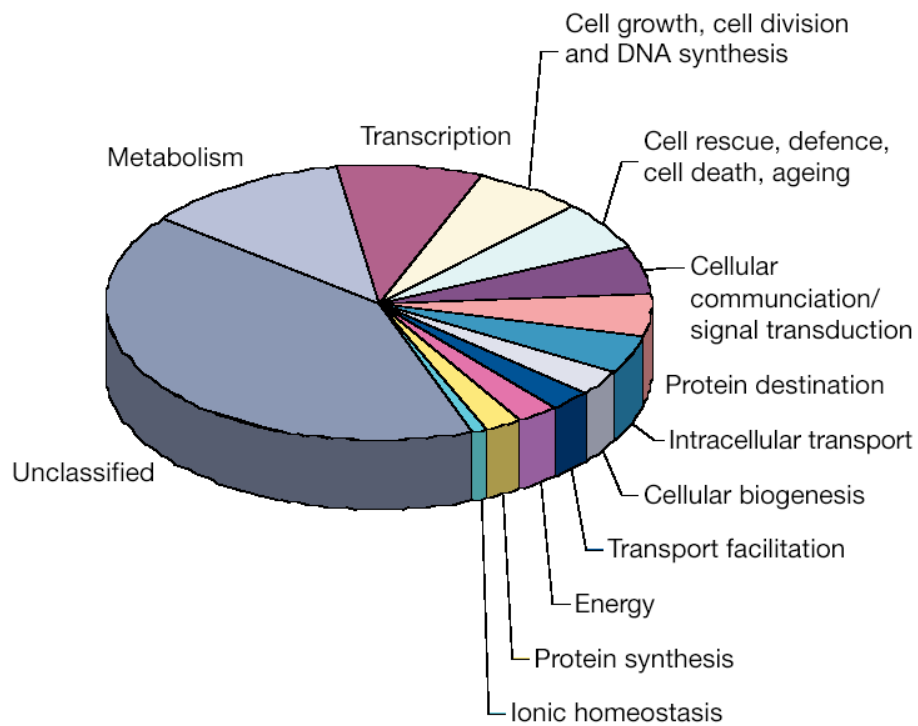
RNAs für das Spleißosom werden auch nicht translatiert

Micro-RNAs: regulatorische RNAs, 22 – 23 Basen lang; sie entsprechen anderen mRNAs, sind aber invertiert → sie binden an die mRNA → RNA-RNA-Hybrid → der Hybrid wird vervollständigt und kann dann leicht und schnell zerschnitten und damit abgebaut werden; Sinn: schnelles Abschalten von Genen

Wie erkennt man eigentlich ein Gen?

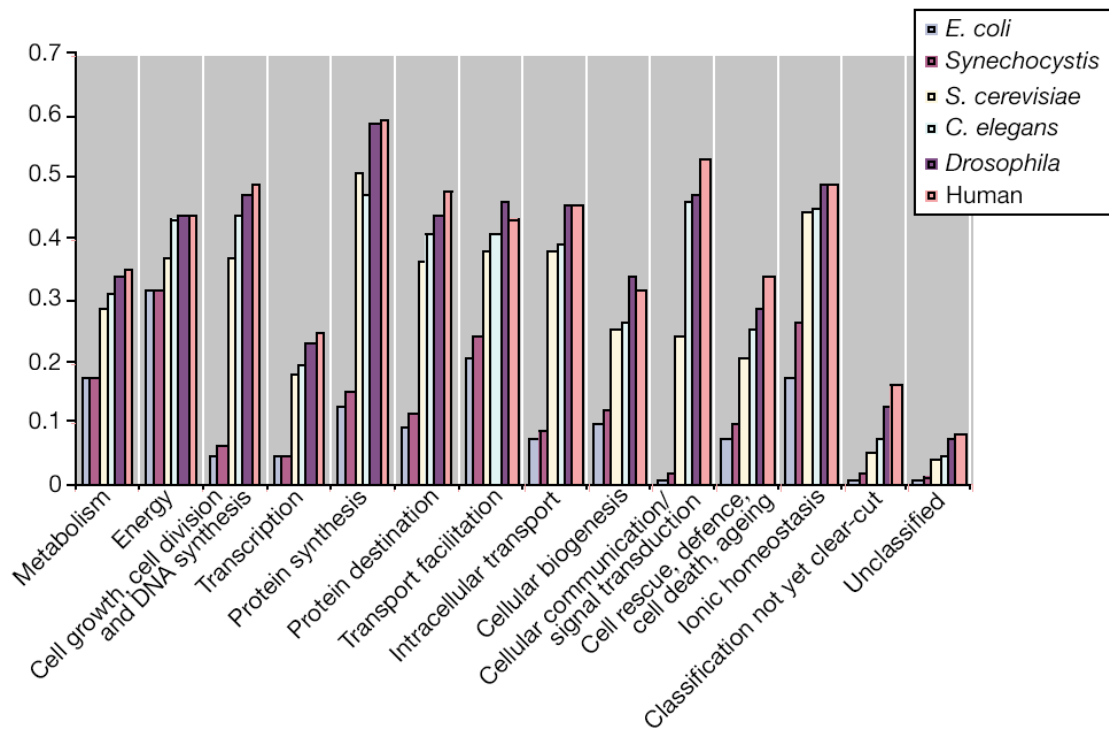
- Promotoren lassen sich nicht erkennen
- TAT-Boxen hat nicht jedes Gen und nicht jedes hat gleich viele
- Intron-Exon-Übergänge lassen sich nicht zählen (i.d.R. Anf. GTAAG, Ende CAG)
- Start- und Stopp-Codon lässt sich zwar finden, aber Leseraster nicht unbedingt klar
- Poly-A-Schwanz nicht an festen, immer gleichen Stellen
- Codon Usage Bias: bestimmte Organismen benutzen bestimmte Codons bevorzugt:
 - Beispiel Prolin: CCA, CCC, CCG, CCT
 - zweikeimblättrige Pflanzen bevorzugen CCC und CCG
 - Beispiel Glycin: GGG, GGC, GGA, GGT
 - zweikeimblättrige Pflanzen bevorzugen GGG und GGC, einkeimblättrige GGA und GGT
- codierende Sequenzen sind bei *Arabidopsis thaliana* G-C-reich, nicht codierende G-C-arm → Screening, Suche nach C-G-reichen Bereichen, dort Suche nach Start- und Stoppcodons, Introns und Exons
- Aber: Manche Gene haben die Codon Usage von einkeimblättrigen Pflanzen; vielleicht sind dies sehr alte Gene?
- unter bestimmten Bedingungen (Stress) regulieren Pflanzen die Übersetzung der Proteine über ihren tRNA-Pool (mehr G-tRNA → G wird schneller translatiert)
- bis zu einer bestimmten Länge wird alles als Gen bezeichnet; was drunter liegt, ist wahrscheinlich kein Gen → scheinbar falsch, es gibt viele Minigene

Zusammensetzung der gefundenen Gene



Wichtig: Die Größe des Kuchenstücks sagt nichts über die Wichtigkeit der Gene!
Beispiel: zweitkleinstes Kuchenstück = Proteinbiosynthese, sehr wichtig

Ähnlichkeit von Gengruppen mit Gengruppen aus anderen Organismen



Synechocystis (Blaualge/Cyanobakterium)

- kleine Übereinstimmung bei Zell-Zell-Kommunikation: Synechocystis ist ein Einzeller, braucht eigentlich keine Zell-Zell-Kommunikation
- große Übereinstimmung bei Energie: Mitochondrien etc. waren wahrscheinlich ursprünglich mal Bakterien (s. Endosymbiontentheorie)

Viele der Gene kommen in Genfamilien vor

Insgesamt konnten 11.601 Gengruppen identifiziert werden, die als Einzelgene oder als (paraloge) Genfamilien mit 2 oder mehr Mitgliedern vorliegen:

	Einzelgen (Singleton)	Familie mit					
		2	3	3	3	>5 Mitgliedern	
<i>Drosophila</i>	72.5%	8.5%	3.4%	1.9%	1.6%	12.1%	
<i>Coenorhabditis</i>	55.2%	12.0%	4.5%	2.7%	1.6%	24.0%	
<i>Arabidopsis</i>	35.0%	12.5%	7.0%	4.4%	3.6%	37.4%	

Die Ursache hierfür sind zahlreiche Tandem-Repeats von Einzelgenen aber auch viele „Large segmental repeats“

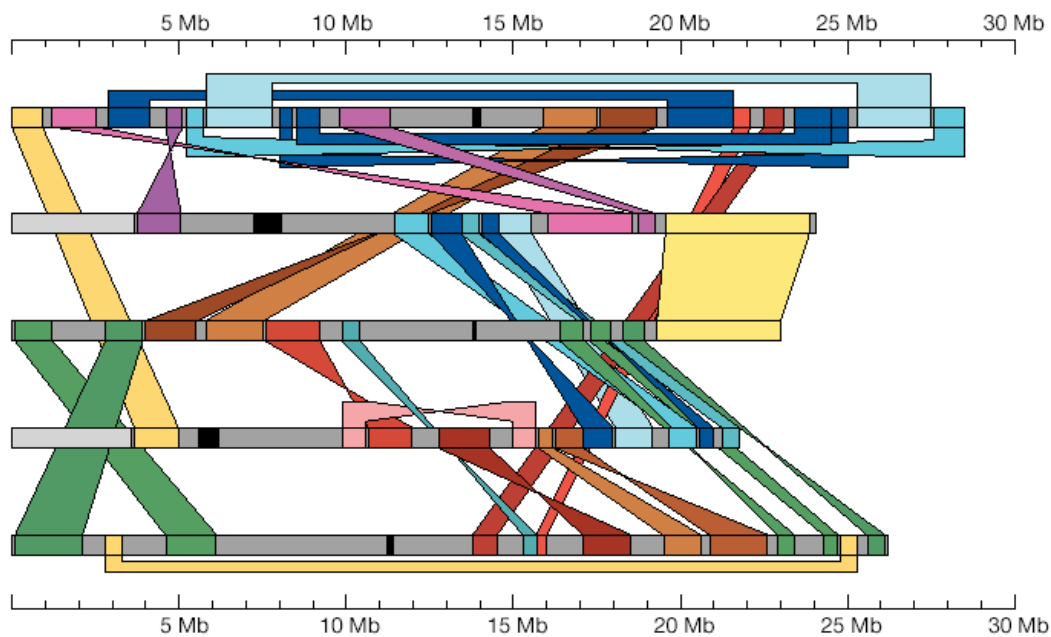


Tandemrepeats: gleiches Gen (in ganz leichter Abwandlung) hintereinander

ATG TGA ATG TGA
_____ > _____ >

Large segmental repeat: linker Arm von Chromosom A entspricht dem rechten Arm von Chromosom B; zwar leichte Veränderung, aber dennoch sehr ähnliche Gene

„Large sequential repeats“ im Arabidopsis Genom



Große Überraschung: *Arabidopsis thaliana* hat so viele „Large sequential repeats“ in ihrem Genom, dass sie mit ihrem haploiden Chromosomensatz nahezu diploid ist

→ Knockout-Versuche sind fast nicht möglich

→ Doppel-, Tripel-, Quadrupel-Knockouts

Arabidopsis hat in ihrem diploiden Genom praktisch einen tetraploiden Chromosomensatz !!!

Man kann aus den Unterschieden zwischen den Sequenzen in den „large segmental repeats“ errechnen, daß diese vor ca. 120 Mio Jahren entstanden sind;

Dies gilt für ALLE weltweit untersuchten Arabidopsis Ökotypen:

z.B. Columbia WT (Co-0) → total sequenziert
Landsberg erecta (La-er)
Wassilevskaja (Ws)
C24
Cap verde Island (Cvi)
etc. etc.



Jedoch:

- ca. alle 3,3 kb kommt es zwischen den einzelnen Ökotypen zu einem Basenaustausch, diese nennt man:

SNP = single nucleotide polymorphism

- ca. alle 6,1 kb kommt es zu einer „Deletion / Insertion“, die die Länge von 2 bis 38.000 bp haben kann;
- aber: ca. 95% dieser Insertionen sind
 - kleiner als 50 bp
 - und durch 3 teilbar;
- d.h. die meisten Proteine vertragen Insertionen von 1 bis 20 Aminosäuren völlig problemlos !



SNPs werden auch „SNiPs“ genannt und sind Punktmutationen, z.B. beim Cap-Verde-Typ: SNiPs in den Genen für Kälteresistenz

Außer in den „hot spots“ (Orte besonders häufiger Mutationen) können Insertionen und Deletionen in Genen auftreten, ohne dass etwas passiert (aus den oben genannten Gründen)

Wie ist das bei anderen Pflanzen ?

- z.B. *Arabidopsis* ↔ *Capsella bursa pastoris*
(Hirtentäschelkraut)

haben sich vor ca. 6,2 bis 9,8 Mio Jahren
auseinander entwickelt !
sehr ähnliche „large segmental repeats“



- z.B. *Arabidopsis* ↔ *Brassica spec.*
(Raps, Kohl, Senf)



haben sich vor ca. 12,2 bis 19,2 Mio Jahren
auseinander entwickelt !
Orthologe:
85% Identität → leicht klonierbar !



Wie ist das bei anderen Pflanzen ?

- z.B. *Arabidopsis* ↔ *Lycopersicum esculentum*
(Tomate)



haben sich vor ca. 150 Mio Jahren
auseinander entwickelt !

- z.B. *Arabidopsis* ↔ *Oryza sativa*
(Reis)



haben sich vor ca. 200 Mio Jahren
auseinander entwickelt !

In beiden Fällen noch immer Genombereiche
mit ähnlichen Strukturen erkennbar !



Weitere Fragen:

- Sind die Gene gleichmäßig über die 5 Chromosomen verteilt ?
- Für welche der vorhergesagten Gene findet man mRNAs ?

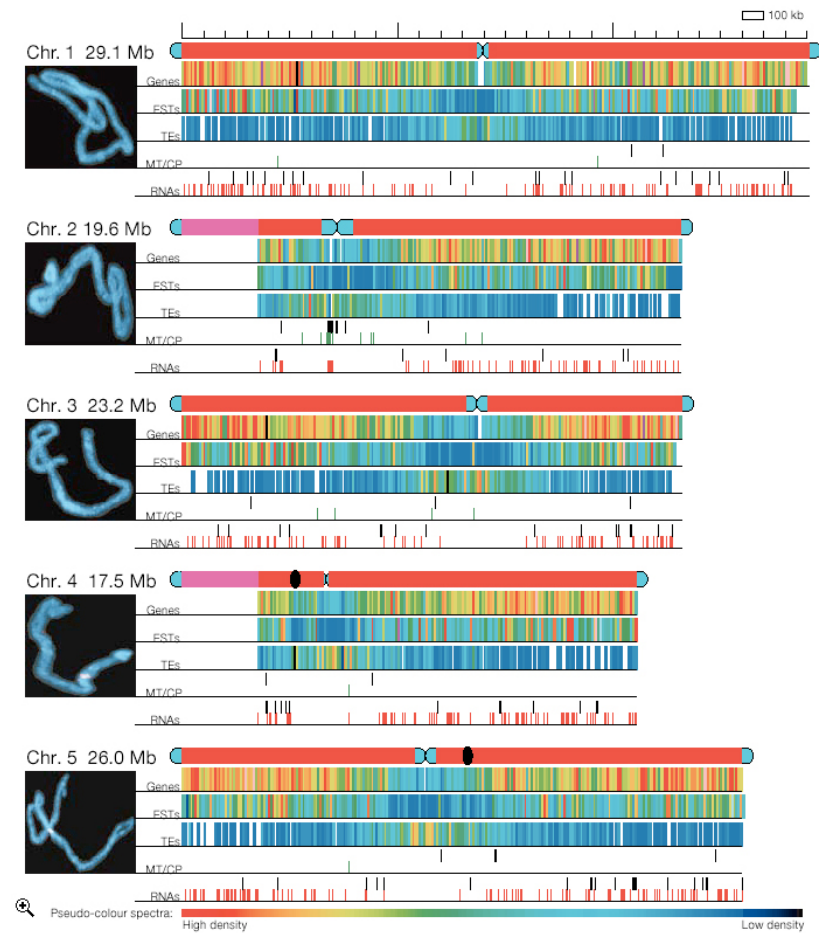
→ EST - Projekte und

→ EST - Banken

EST = expressed sequence tag



Verteilung von Genen, ESTs und Transposons auf den 5 Chromosomen von *Arabidopsis thaliana*



FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie



Rosa: repetetive Sequenzen von ribosomaler RNA

TE: Transposable Elemente; keine Gene → Transposons sind nicht schädlich, können sich akkumulieren und sitzenbleiben

Agrobakterien können Pflanzen transformieren

- Agrobakterien sind gram⁻ Bodenbakterien;
- Agrobakterien sind das einzige bekannte System, das gezielt DNA über die Grenzen von Organismenreichen übertragen kann;
- Agrobakterien können ein Plasmid von ca. 200.000 bp tragen, das ihnen erlaubt auf Höhere Pflanzen eine Krankheit zu übertragen, die entweder zur Tumorbildung führt

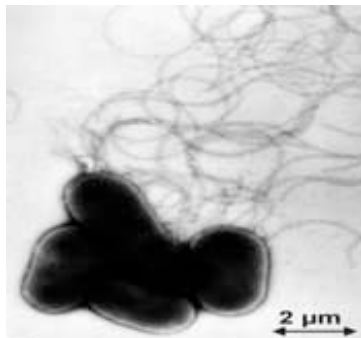
Agrobacterium tumefaciens

oder zur ectopischen Ausbildung von Wurzeln

Agrobacterium rhizogenes



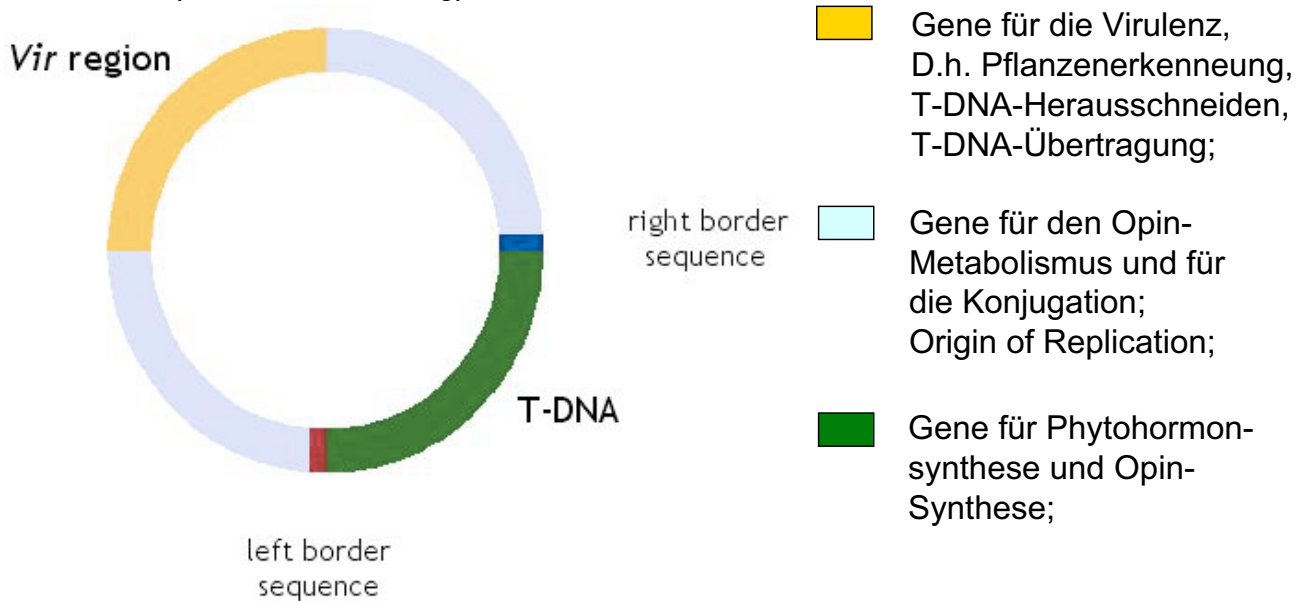
Agrobakterien können Pflanzen transformieren



Agrobakterien können Pflanzen transformieren

• Das Ti-Plasmid

(Ti = tumor inducing)



FAU ERLANGEN - Molekulare Pflanzenphysiologie



Plasmid erlaubt

- Pflanzen zu erkennen
- Pflanzen zu attackieren
- Verbindungskanäle zwischen Pflanze und Bakterium herzustellen
- einen Teil des Plasmids zu übertragen

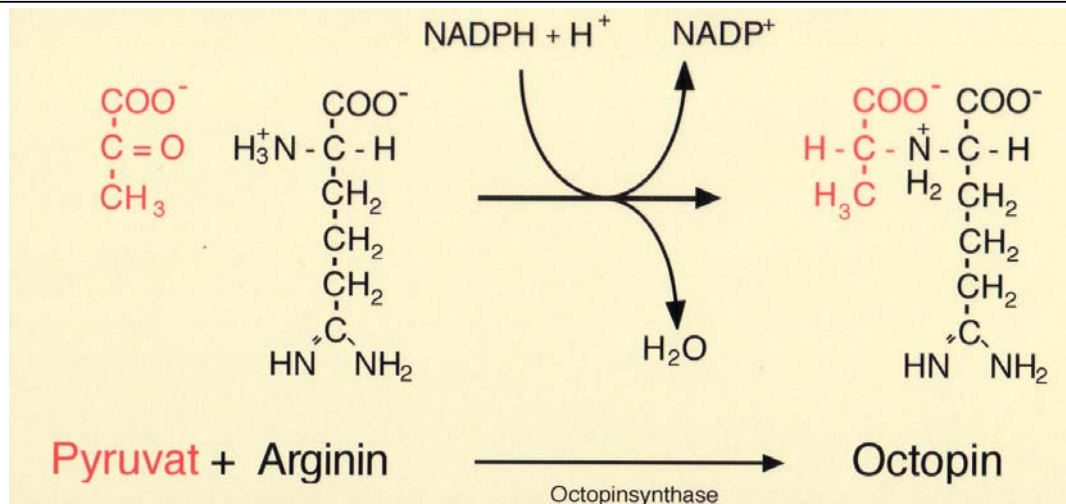
Verletzte Pflanzen senden **Phenole** aus, wodurch *Agrobacterium tumefaciens* angelockt wird, in die Verletzung hinein schwimmt und die DNA überträgt, die eine Wucherung hervorruft

Agrobacterium tumefaciens schadet Bäumen, weil Energie für die Tumorbildung gebraucht wird und dem Baum nicht mehr zur Verfügung steht → langsames Wachstum

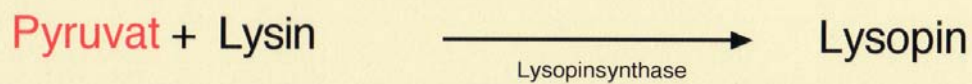
T-DNA = Transfer-DNA

Die Identität einer Pflanzenzelle wird über Hormone gesteuert; *Agrobacterium tumefaciens* produziert Hormone, die „Wundschorf“ / Kallus / nicht determiniertes Gewebe machen (bei *Agrobacterium rhizogenes* Wurzeln)

Was sind Opine ?



in einem anderen Stamm von *Agrobacterium tumefaciens*:



Opine:

- kohlenstoff- und stickstoffreiche Moleküle verbunden / gekoppelt
- Pflanzen brauchen das nicht
- Bakterien fressen Opine, die ausgeschieden werden

Agrobakterien können Pflanzen transformieren

- Die **vir-Region** trägt u.a die Gene, die für die Erkennung einer „transformierbaren“ Pflanze nötig sind sowie für das Anschalten der Transformation:
-

- **virA** ist ein Rezeptor für phenolische Substanzen, die von Pflanzen unter Stress ausgeschieden werden;
 - **virG** ist ein Transkriptionsfaktor, der die restlichen vir-Gene anschaltet;
 - **virC** ist ein DNA-bindendes Protein, das unmittelbar neben der RB-Sequenz bindet - positioniert **virD**;
 - **virD** ist eine Nuklease, die an der RB-Sequenz bindet und einen Einzelstrang der T-DNA „abschält“ (**NLS**);
 - **virE** ist ein DNA-bindendes Protein, das die einzelsträngige DNA vor Abbau schützt (**NLS**);
-



virA:

- muss erkennen, ob verletzte Pflanzen in der Nähe sind
- es folgt eine Autophosphorylierung
- das phosphorylierte virA phosphoryliert virG

virG:

- induziert die restlichen Gene

virC:

- bindet direkt neben der RB-Sequenz (right border sequence) und positioniert das virD-Protein

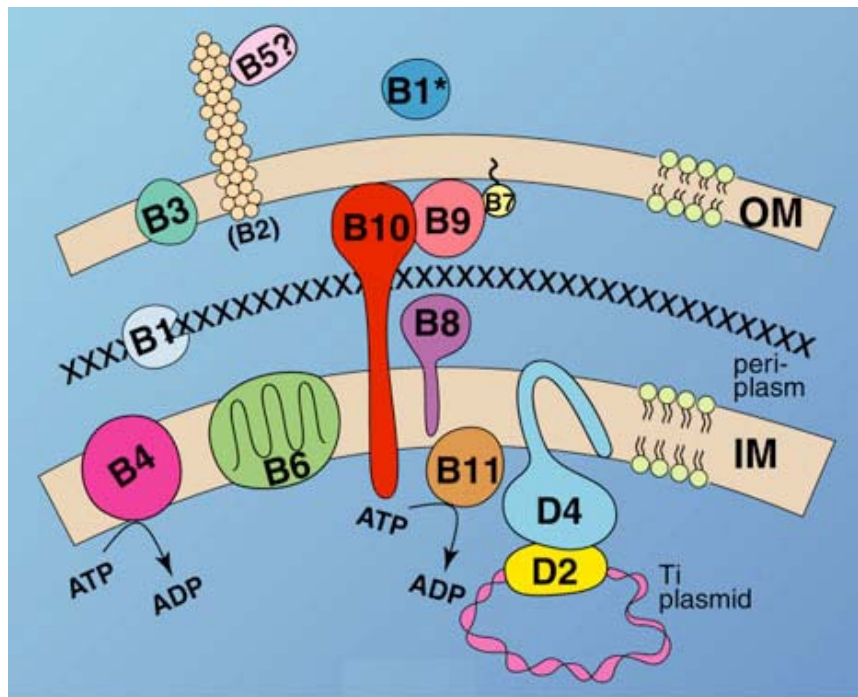
virD:

- liest T-DNA ab
- bleibt an ssDNA hängen, muss mit ihr in die Pflanze hinein
- Aufgabe: Bakterien-DNA in Pflanzen-DNA einbauen (NLS = nuclear localication sequence, „Schlüssel, um in Kern rein zu kommen“, 4 – 6 stark negativ geladene Basenpaare); Einbau erfolgt völlig statistisch (zufällig)

virE:

- bindet an Bakterien-DNA, um sie vor Abbau zu schützen; NLS

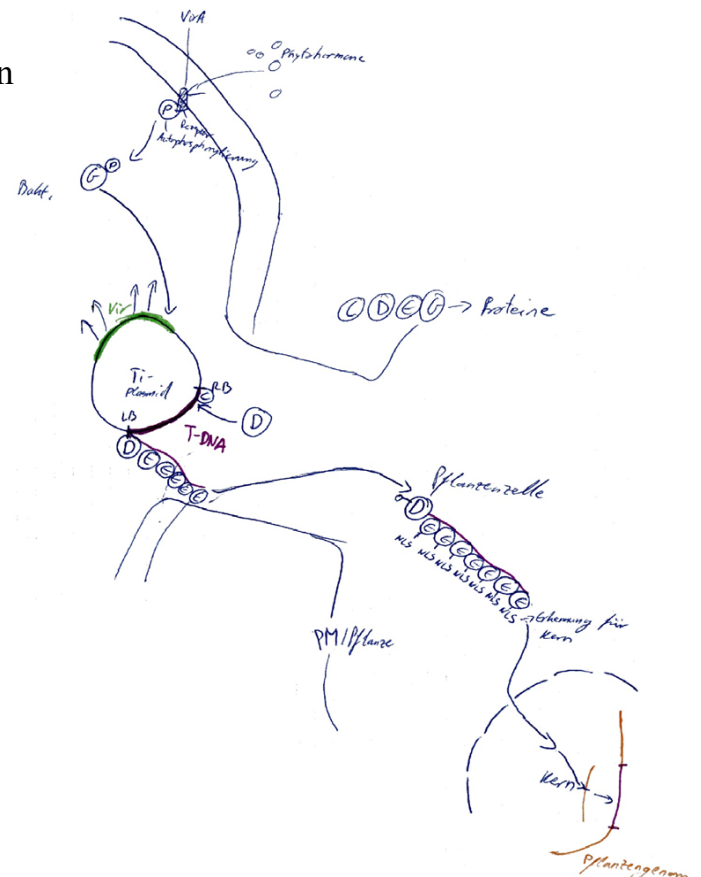
Die Rolle der VirB-Proteine

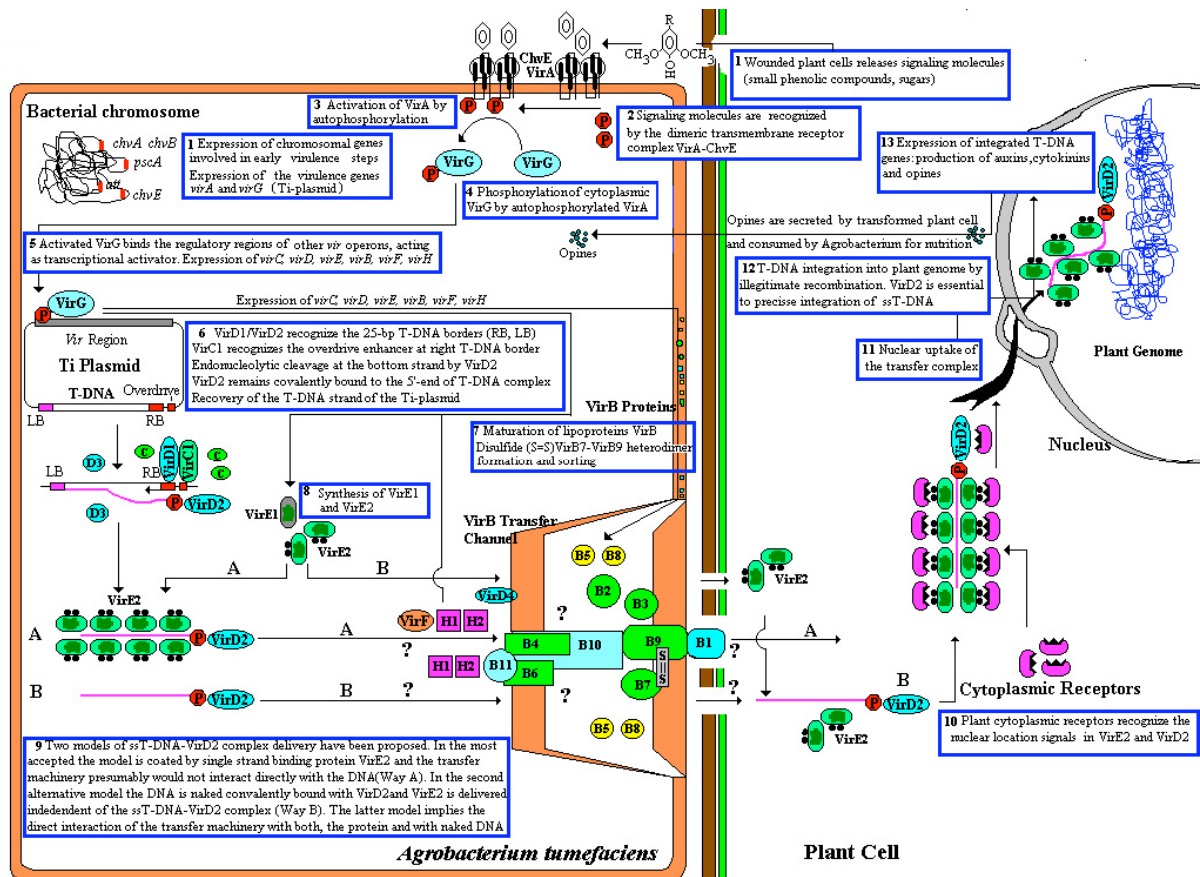


FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie



virB:
eine ganze Gruppe von virB-Proteinen
macht einen Kanal bis in die Pflanzenzelle





Genbezeichnung bei Arabidopsis thaliana

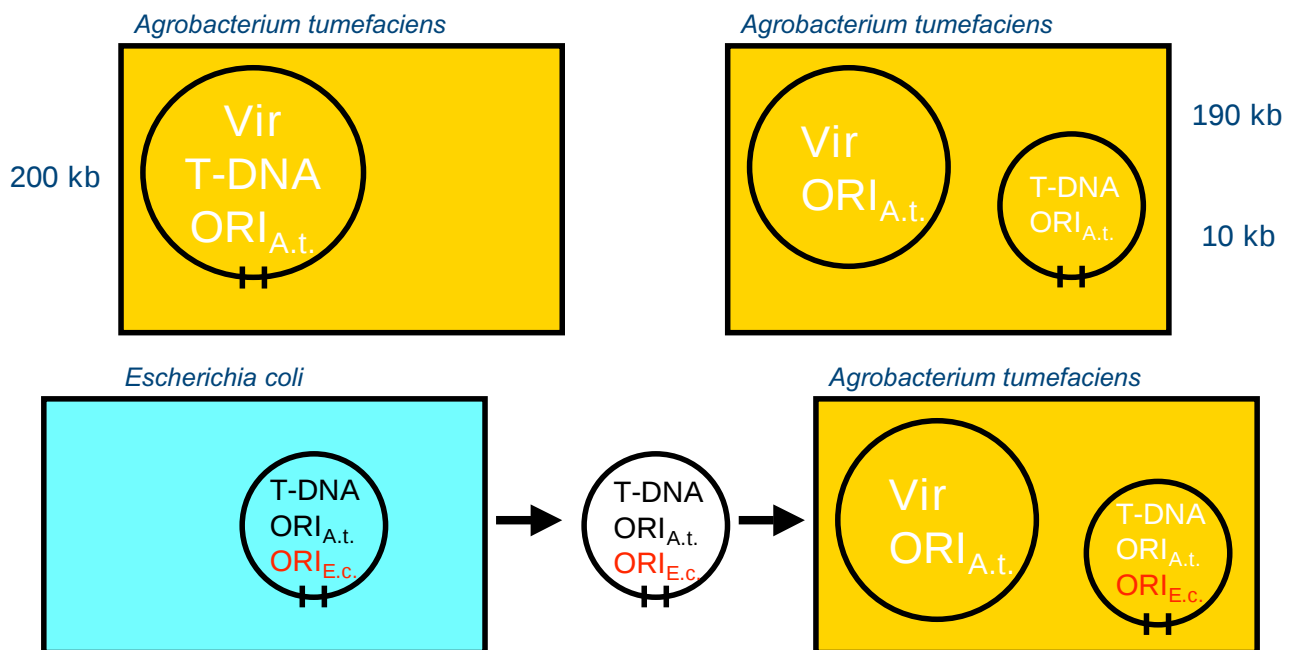
MIPS # At2g27350
At2g27340

immer in Zehnerschritten, falls man noch Gene findet, kann man sie einfügen

Insertionen von T-DNA kommen bevorzugt in hot spots vor, sind aber auch woanders möglich

Es ist nicht nötig, dass Vir-Gene und T-DNA auf einem Plasmid sind

Binäres Vektorsystem



FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie



Große Plasmide (> 10 kbp) sind im Labor schlecht zu handhaben → man zerlegt das ca. 200 kbp große Ti-Plasmid in ein großes Plasmid von 180 – 190 kbp, welches den Ori und die Vir-Region enthält. Dieses große Plasmid verbleibt in den Bakterien. Das zweite, kleinere Plasmid von ca. 10 – 20 kbp enthält einen Ori, die right border und die left border sequence sowie die eigentlich T-DNA. Dieses Plasmid lässt sich in E. coli im Labor vervielfältigen und bearbeiten, wofür es lediglich noch einen E. coli-Ori braucht (sonst kann es ja nicht abgelesen werden). Das in E. coli klonierte Plasmid bringt man dann wieder in die Agrobakterien ein – die vir-Region ist dort noch auf dem großen Plasmid vorhanden, die T-DNA, die das Bakterium in die Pflanze einbringt, ist nun vom Experimentator in E. coli kloniert worden und daher gezielt hergestellt.

Zwei Vektoren, die zusammen arbeiten → **binäres Vektorsystem**

Damit das Plasmid zum Shuttle-Plasmid zwischen *Agrobacterium tumefaciens* und E. coli wird, muss noch ein E. coli-Ori rein → E. coli vermehrt das Plasmid

Wie kann man im Labor Pflanzen mit Agrobakterien transformieren

- Ursprünglich immer nach

Verletzen der Pflanze,
Coinkubation von Pflanze und Bakterien,
Abtöten der Agrobakterien,
Selektion von Kallusgewebe,
Regeneration intakter Pflanzen;

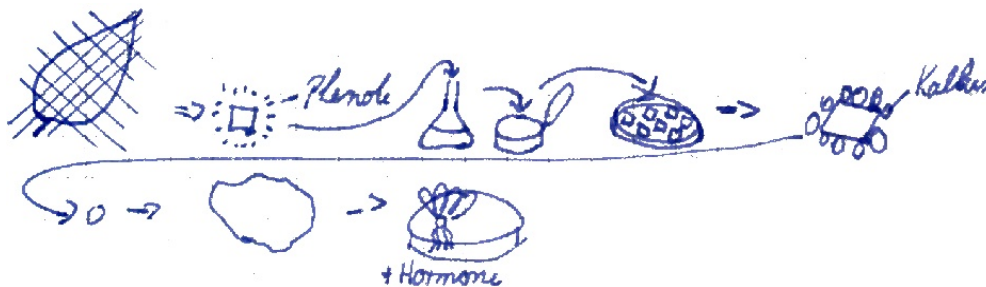
- Ursprünglich immer nach

Durch Tauchen von Pflanzen in
Bakterienkulturen

FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie



- man zerschneidet ein Blatt in viele kleine Stückchen → „das Blatt, da werden Sie mir zustimmen, ist massiv verletzt“
- die Stückchen, da verletzt, senden Phenole aus
- man taucht die Stückchen in eine Nährlösung mit *Agrobacterium tumefaciens*, das die gewünschte DNA übertragen soll
- auf einem Nährboden wächst an den verletzten Rändern der Blattstückchen Kallus
- man schneidet einen Kallus ab und lässt ihn wachsen (wichtig: Test, ob transgen oder nicht!)
- gibt man Hormone dazu, so entwickelt sich aus dem Kallus eine transgene Pflanze



Arabidopsis muss man nur in Bakterienkultur tauchen → nach ca. 4 Wochen hat man z.T. transformierte Samen

Wichtig: Abtöten der Agrobakterien, sonst hat man stets kontaminierte Pflanzen

Die Rolle der VirB-Proteine

- Elektroporation
- Particle Gun

2 Fragen:

- sind diese Transformationen stabil oder nur transient ?
- Welche Fragen kann man damit beantworten ?



Elektroporation nicht so erfolgreich, aber geht, wenn es mit Agrobakterium nicht geht

Particle Gun:

DNA + Goldstaub + bestimmte Lösungsmittel → DNA klebt an Goldkügelchen → mit Helium erzeugt man einen Überdruck → Schuss, reicht z.T. bis in den Zellkern, wo die DNA dann ist und evtl. exprimiert wird

Stabilität:

Agrobakterium: immer stabil integriert

sonst: nicht stabil integriert, sind zwar im Zellkern, werden aber bei Zellteilung nicht mit weitergegeben

Beantwortbare Fragen:

z.B. „Funktioniert mein Mais-Promotor mit einem beliebigen Gen (z.B. GFP) überhaupt in Bohnen? Hier ist es nicht wichtig, dass das Gen weitergegeben wird, es reicht, wenn das Gen nur vorübergehend exprimiert wird (Juhu, es leuchtet → mein Promotor geht in der Bohne!)“

Resistenzgene für die Pflanzentransformation

- Anfangs nur Resistenzen gegen Antibiotika

In der Regel durch bakterielle Gene, die das Antibiotikum durch Acetylierung oder Phosphorylierung inaktivieren;

z.B. gegen **Chloramphenicol** (Chloramphenicol-Acetyltransferase)
gegen **Kanamycin** (Neomycin-Phosphotransferase)
gegen **Hygromycin** (Hygromycin-Phosphotransferase)

- Seit etwa 15 Jahren auch **Herbizidresistenzen**;

- Resistenz gegen **2-Desoxyglukose** (2-DOG);

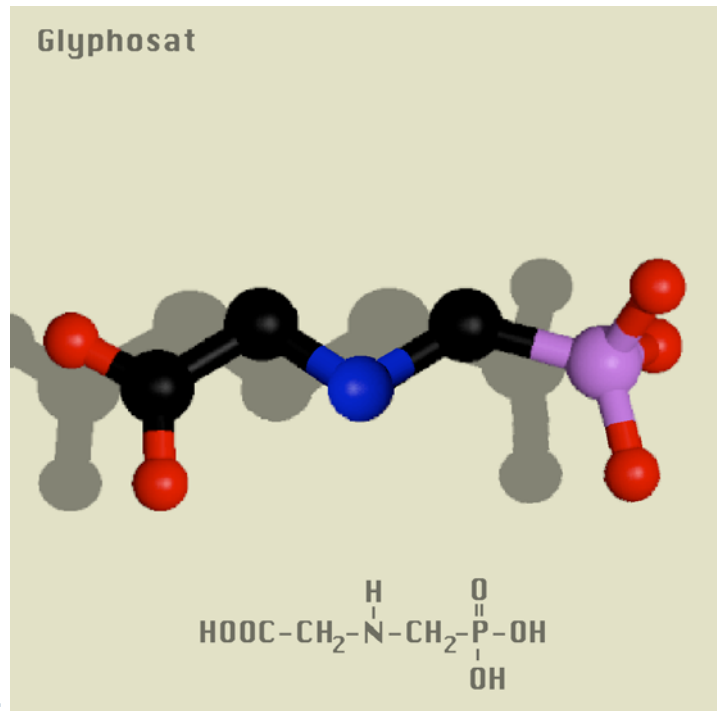
DOGR1 Gen aus ***S. cerevisiae*** (DOGR1 = 2-DOG-Phosphatase);



Vorteil der Herbizidmethode: kein steriles Arbeiten mehr nötig, was nicht transformiert wurde, stirbt einfach

Resistenz gegen Glyphosat:

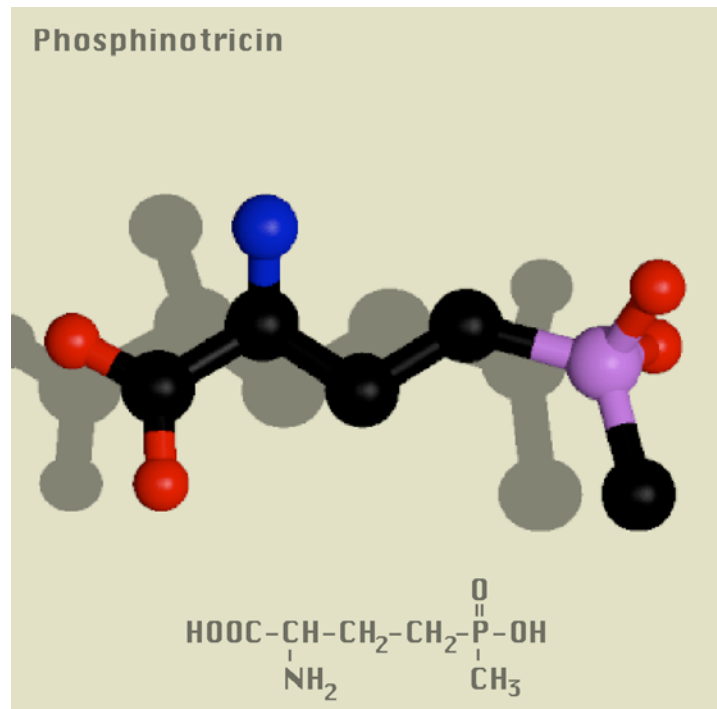
- Wirkstoff des Totalherbizids **ROUNDUP**;
- Wurde 1974 von **MONSANTO** auf den Markt gebracht;
- **hemmt** die **3-Enolpyruvylshikimat-5-P-synthase** in den Chloroplasten / Totalhemmung der Proteinsynthese;
- Halbwertszeit im Boden: 30 - 60 Tage !!!
- Resistenz: **Glyphosat-resistente EPSP** aus Bakt.;



über den Shikimatweg werden aromatische Aminosäuren (z.B. Phenylalanin) gebildet → Störung hat zur Folge, dass ein Teil der Aminosäuren (die aromatischen nämlich) nicht mehr gebildet werden können → sie fehlen → keine Proteinbiosynthese möglich → Tod der Pflanze

Resistenz gegen Phosphinotricin:

- Wirkstoff des Totalherbizids **BASTA**;
- Racemat (= **Gluphosinat**) wurde 1984 von BAYER auf den Markt gebracht (jetzt Agrevo);
- **hemmt** die **Glutaminsynthase** / keine Verstoffwechselung von NH_4 = tödlich !
- Halbwertszeit im Boden: 3 - 10 Tage !!!
- Resistenz durch **BAR-Gen** von Streptomyceten;



Glutamat = wichtiges Akzeptormolekül
BASTA = Glutamatanalogs

Resistenz gegen ROUNDUP und BASTA:

- **ROUNDUP**: aus *Agrobacterium spec.*;
Resistenz durch **nicht-hemmbares Protein**;
Halbwärtszeit im Boden - 30 - 60 Tage !!!
- **BASTA**: aus *Streptomyces viridochromogenes*;
Resistenz durch **Phosphinotricin-Acetyltransferase**;
Halbwärtszeit im Boden - 3 - 10 Tage !!!



Denkbare Ziele einer Transformation

- Überexpression eines Gens;
 - eigenes Gen
 - Fremdgen
 - eigener Promotor
 - fremder Promotor (ektopische Expression)
- Frage nach der Expression eines Gens;
 - Wo ?
 - Wann ?
 - Wie stark ?
- Was passiert wenn dieses Gen fehlt?
 - Antisense RNA
 - RNAi
 - T-DNA Insertion



eigenes Gen wird oft zurückreguliert → möglichst fremdes Gen, z.B. im Golden Rice (Vitamin A-Gen aus der Narzisse)

ektopisch: woanders als sonst, z.B. Wurzel-Gen im Blatt

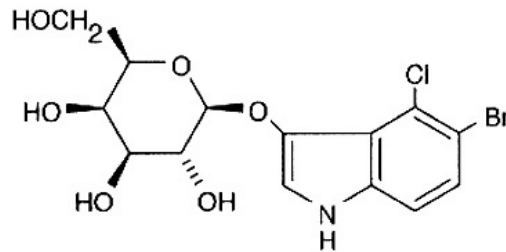
Promotoranalyse, z.B. mit GFP: Wo, wann, wie stark leuchtet es?

Pflanzen können keine Disruption wie z.B. Hefe

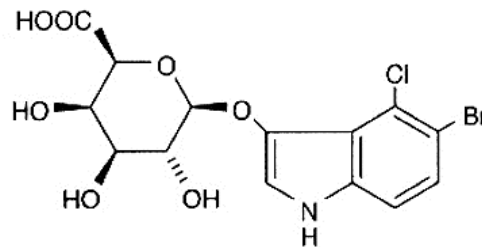
RNAi: RNA interference, Pflanzen können RNA inaktivieren, kann man für eine spezifisches Gen anschalten

Reportergene für die Pflanzentransformation

- β -Galaktosidase aus *Escherichia coli*



- β -Glukuronidase aus *Escherichia coli*



FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie



β -Galactosidase:

- im lac-Operon
- Substrat: gebunden farblos, gespalten blau; in Pflanzen nicht verwendbar, haben schon eine β -Galactosidase

β -Glukuronidase

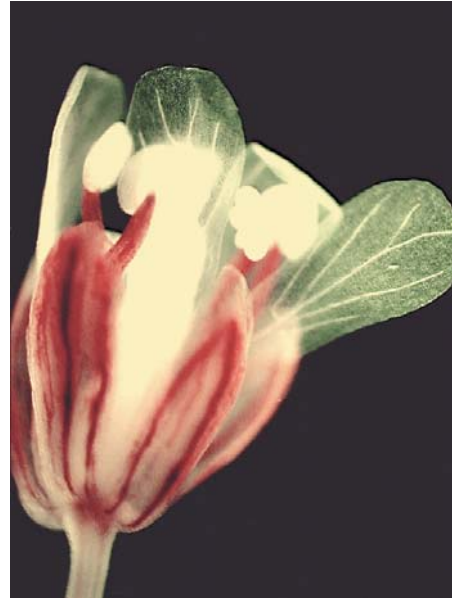
- in Pflanzen einsetzbar
- Promotor ist dort aktiv, wo es blau wird, wenn man die Pflanze ins Substrat taucht
- erst Pflanze entfärben (Chlorophyll in 70 % Alkohol lösen), dann kann man Farbe sichtbar machen durch Eintauchen
- je länger mit Substrat in Kontakt, desto intensivere Färbung → auch für schwache Promotoren geeignet
- Enzym sehr stabil → ob Promotor an- oder abgeschaltet wird, ist nicht nachvollziehbar

Reportergene für die Pflanzentransformation

- β -Glukuronidase aus *Escherichia coli*



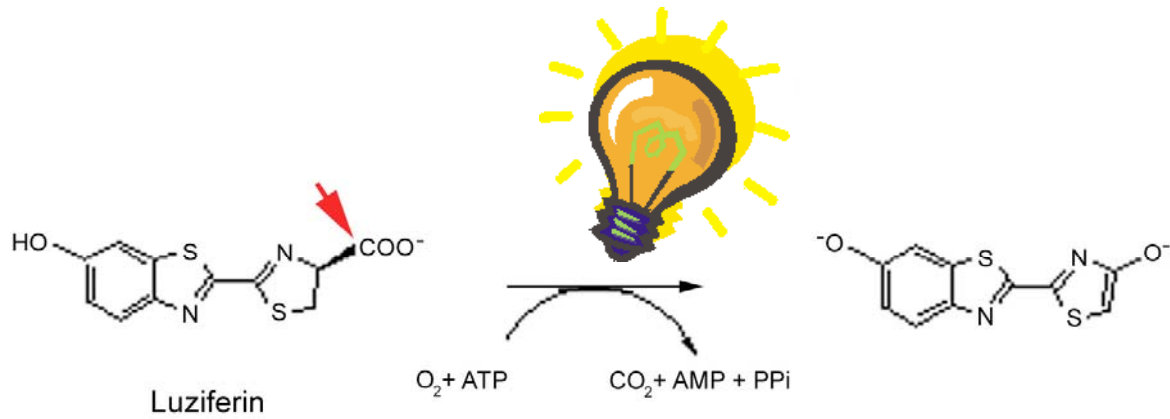
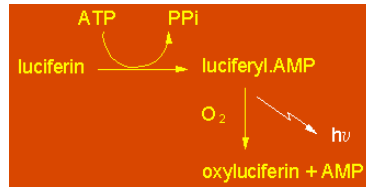
• AtSUC1::GUS



• AtSUC2::GUS



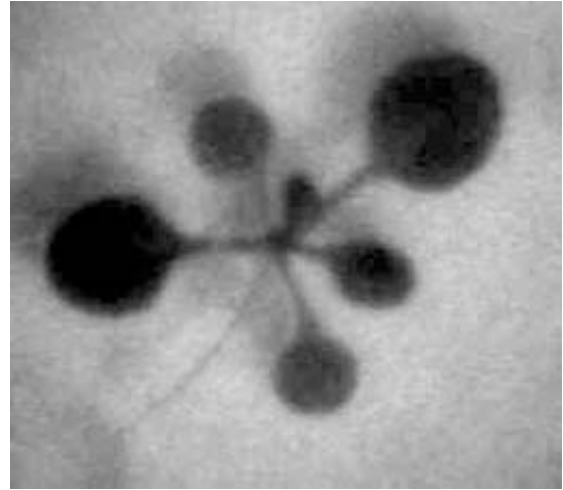
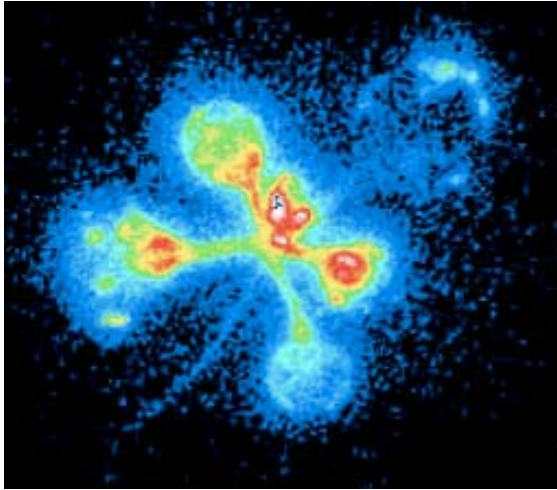
Biolumineszenz Im Glüh- würmchen *Photinus pyralis*



Glühwürmchenenzym Luciferase

- eine Oxidase
- ein Gen → ein Protein (Enzym)
- Luciferase aktiviert Luciferin, gleiches Enzym setzt es dann wieder um

Luciferase-anhängiges Leuchten in einer transgenen *Arabidopsis* Pflanze



FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie

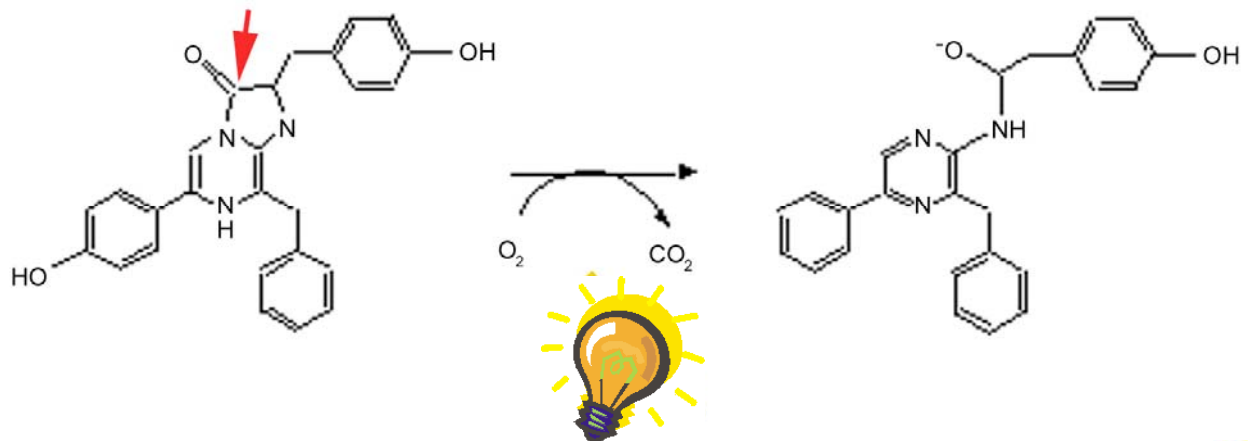
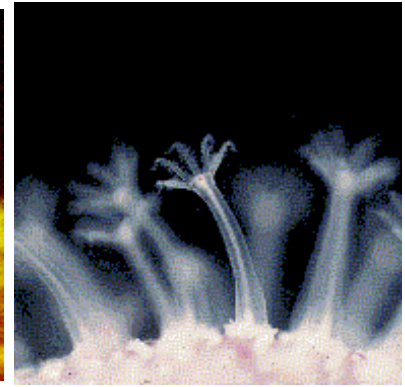
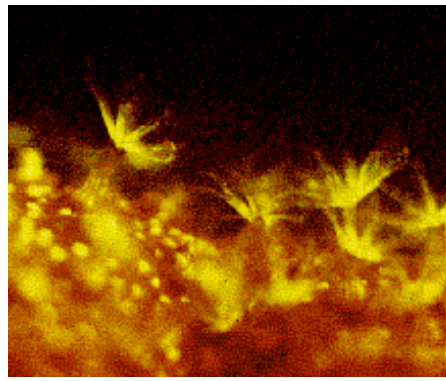


lebende Pflanze mit (großtechnisch hergestelltem) Luciferin gießen → Aufnahme über Wurzeln, Verteilung in Pflanze → wo Promotor aktiv, leuchtet die Pflanze; wenn Promotor an, leuchtet die Pflanze, wenn Promotor aus, leuchtet Pflanze nicht, weil Protein nicht sehr stabil

emittiertes Licht so schwach, dass Photomultiplier notwendig, der einzelne Photonen „sieht“, selbst in Dunkelkammer nicht mit bloßem Auge sichtbar

Biolumineszenz
in der Tiefsee-
koralle

***Renilla
reniformis***

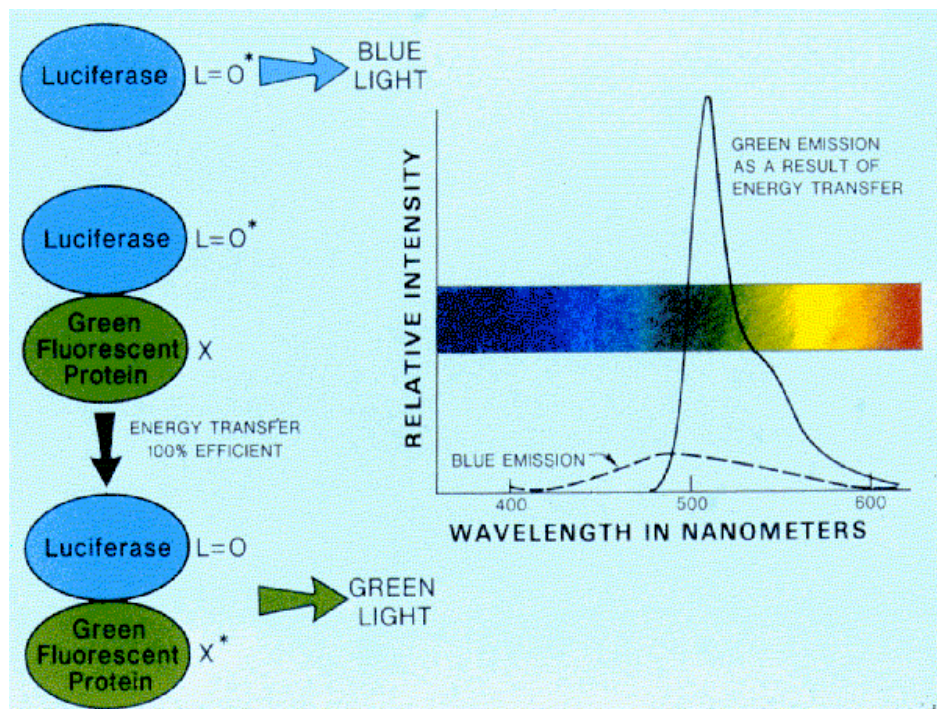


FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie



Tiefseekorallenenzym reagiert auf genau die selbe Art und Weise

Strahlungsfreie Übertragung der Energie von Luciferase auf GFP in *Renilla*



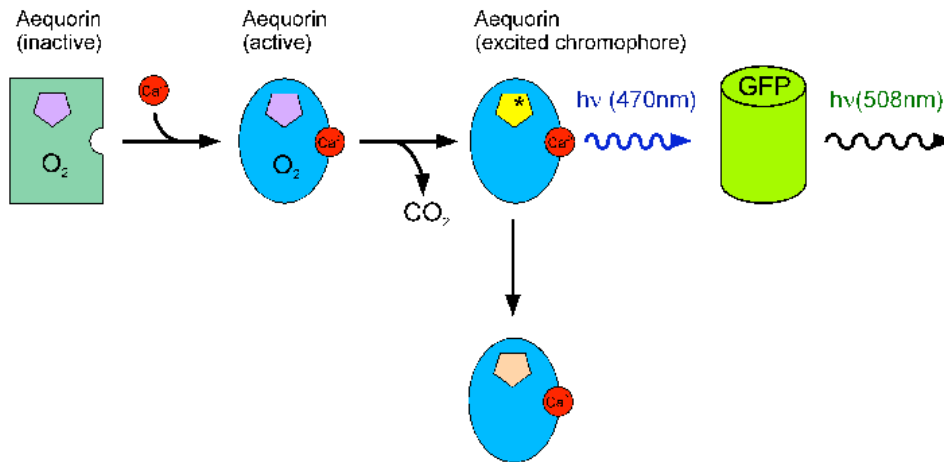
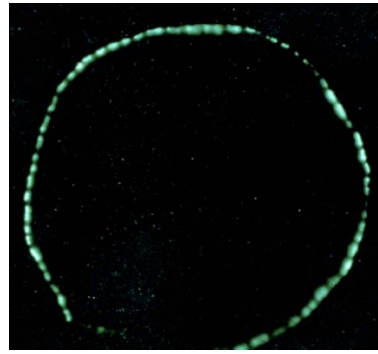
FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie



Glühwürmchenluciferase gereinigt → gleiche Wellenlänge wie im Tier

Korallenluciferase gereinigt → blaues Licht!, aber schwach
in Koralle mit GFP gekoppelt → Aktivierungsenergie wird von Luciferase an GFP weitergegeben, das leuchtet dann; im Bild sieht man, dass es viel stärker ist

Biolumineszenz in der Tiefsee- qualle *Aequorea victoria*



FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie



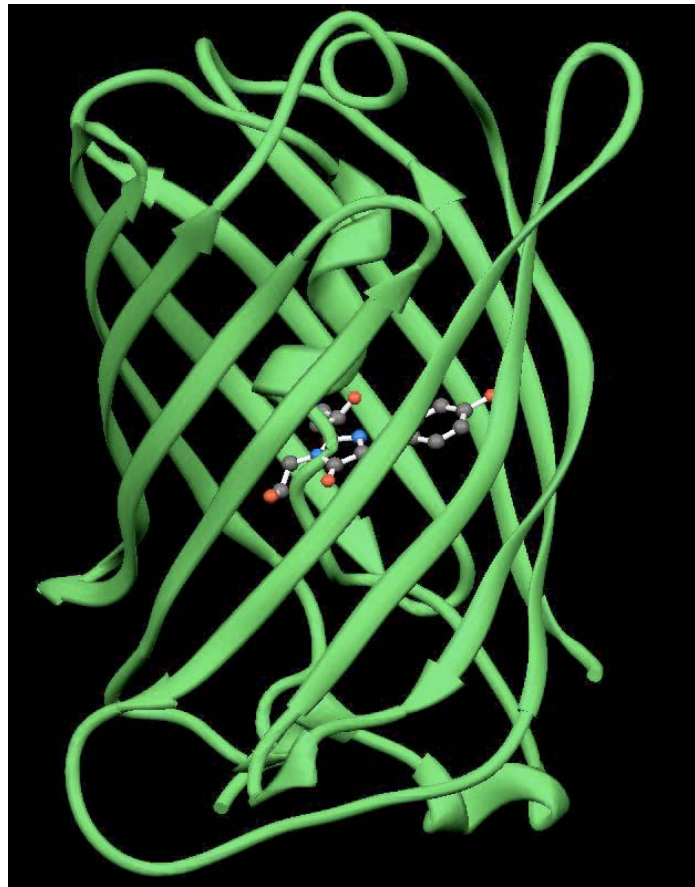
Quallen leuchten, wenn Aquarium umgerührt wird, am Mantelsaum – warum sie es nur unter Stress machen, unbekannt / unverstanden

Anderes System:

Aequorin durch Ca aktiviert (Bindung → Konformationsänderung), fällt zurück auf inaktivierten Zustand → sendet Licht aus (dieses aktiviert das GFP)

Ca klassische Stresssubstanz

The green fluorescent Protein GFP



FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie



fehlende Folie (hat er wohl nachträglich eingefügt):

Drei Beispiele für Biolumineszenz:

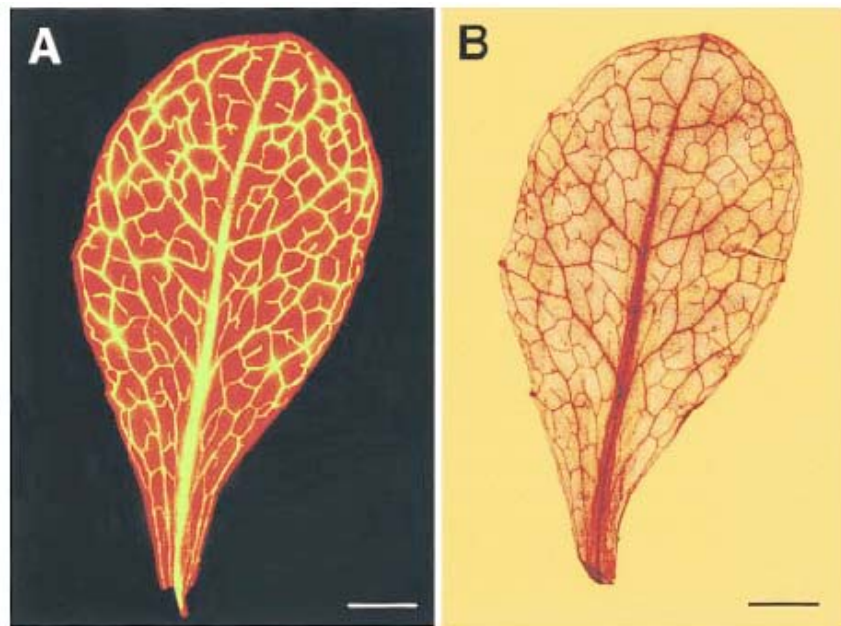
- | | |
|-----------------------------|--------------|
| A) Luciferase → Licht | Glühwürmchen |
| B) Luciferase → GFP → Licht | Koralle |
| C) Aequorin → GFP → Licht | Qualle |

GFP alleine als Reportergen in Pflanze (Halbwertszeit ca. 6 Stunden) → Pflanze einfach in Dunkelkammer mit anregendem Licht bestrahlen, Leuchten → lebende Pflanze kann über ihr ganzes Leben beobachtet werden und muss nicht entfärbt und damit getötet werden → man kann wirklich immer den gleichen Organismus untersuchen!

Aequorin: klassischer Kalziumsensor, Dunkelkammer → Stress → Licht → Änderungen des Kalziumspiegels in einzelnen Zellen

GFP: β -Barrel Struktur, außen lauter β -Faltblätter

GFP-anhängiges Leuchten in einer transgenen *Arabidopsis* Pflanze

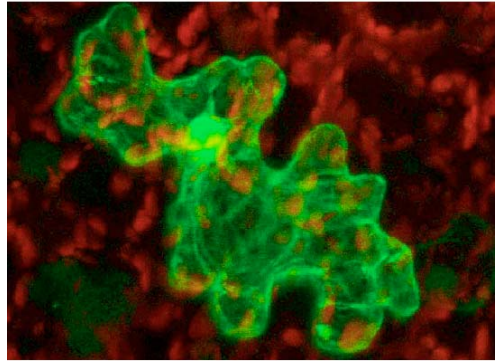


FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie

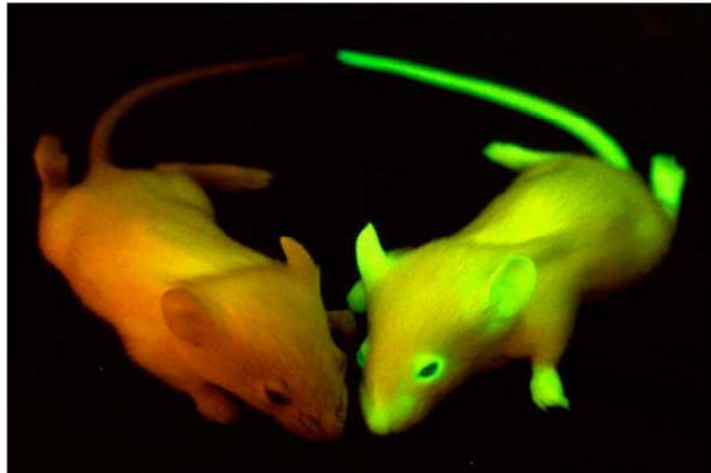
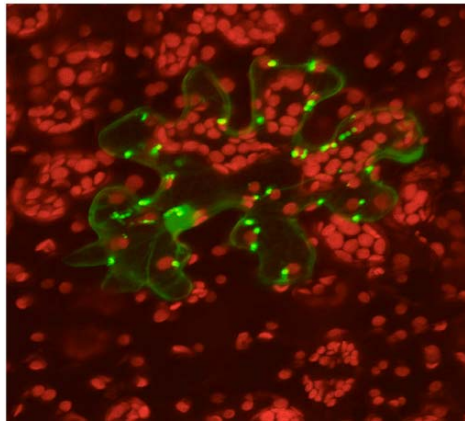


- A: in lebender Pflanze; nur in Geleitzellen (winzig)
- B: entfärbtes Blatt

Grün so stark, dass es gelb erscheint



GFP
in
action



FAU ERLANGEN – Molekulare Pflanzenphysiologie

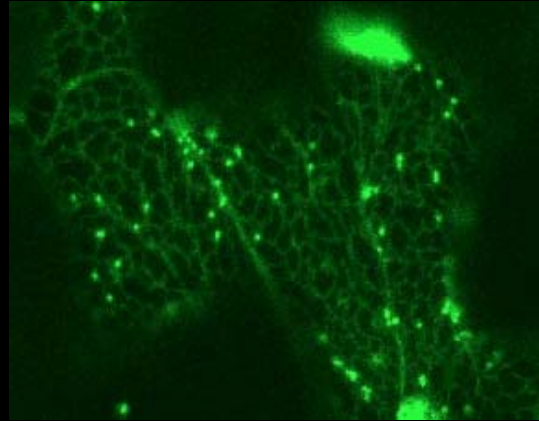


GFP akkumuliert ein wenig im Zellkern

GFP ist mit anderen Enzymen kombinierbar → geht dorthin, wo man es haben möchte (nämlich dort, wo das andere Enzym auch hingehet)

bei starken Promotoren ist das Leuchten des GFP so stark, dass man es in der Dunkelkammer mit bloßem Auge sehen kann

GFP-Fluoreszenz einer HDEL-Fusion
im Endoplasmatischen Reticulum (schwach)
und im Golgi (stark)



GFP 

→ Mutagenese, Selektion, Neusynthese



eGFP: enhanced GFP, je nach Codonbedarf (Einkeimblättrige, Zweikeimblättrige etc.)
neu synthetisierte GFP → Pflanze kann es besser umsetzen → Leuchten stärker

Posttranskriptionelles Gene-silencing

(PTGS)

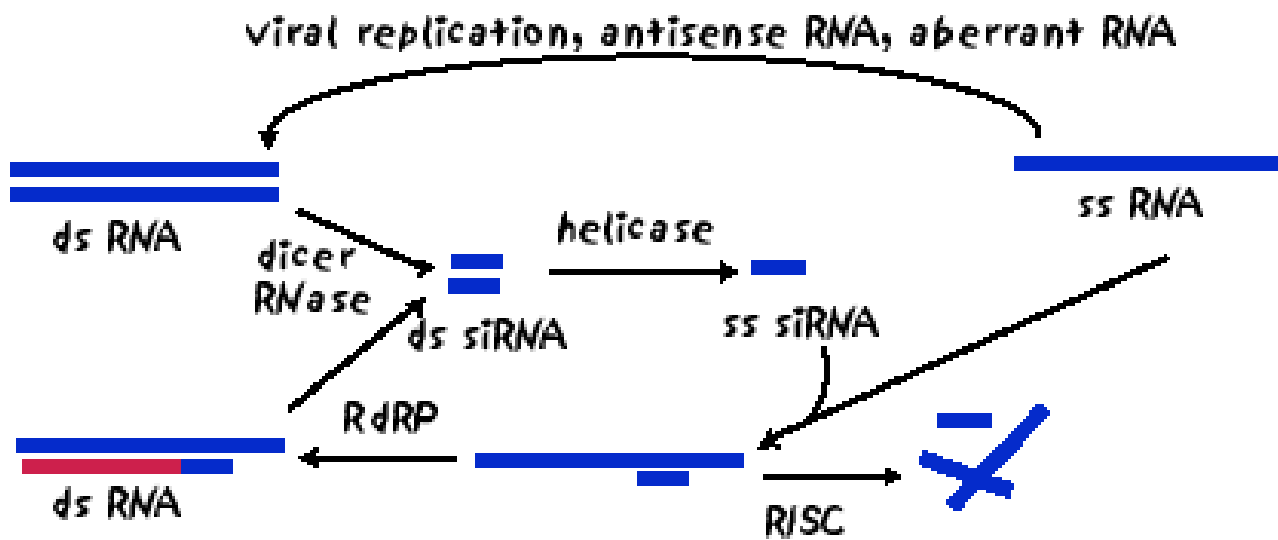
- über antisense mRNA;
 - über Cosuppression;
 - über gleichzeitige Überexpression und antisense mRNA;
 - über RNAi;
-
- Mutanten, die nicht mehr zu PTGS fähig sind zeigen Mutationen in:
 - RNA-abhängigen RNA-Polymerasen
 - dsRNasen
 - Helicasen
- Modell



PTGA zur indirekten Regelung der Genaktivität

- „antisense“ auf „sense“ → Aktivität des Gens wird runtergefahren
- „sense“ + „sense“ → Überexpression / Cosuppression → in 10 % aller Fälle ist das Gen dann ganz weg!
- „sense“ + „antisense“ + „sense“ → 100 % perfektes Abschalten

Posttranskriptionelles Gene-silencing

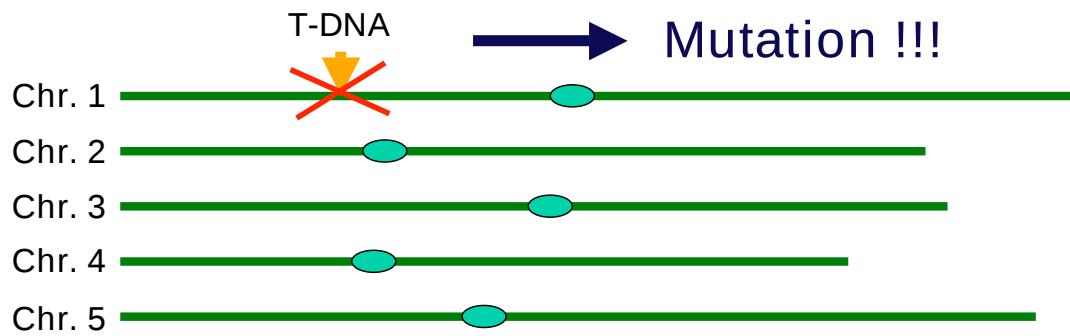


Will man ein Gen ausschalten, macht man ds-siRNA und schießt die auf Goldkügelchen in die Zellen

Nur in Pflanzen wird so im ganzen Organismus das Gen ausgeschaltet!

Gleichzeitig: Transkriptionelle Abschaltung durch Methylierung der DNA

Herstellung von Mutantenbanken

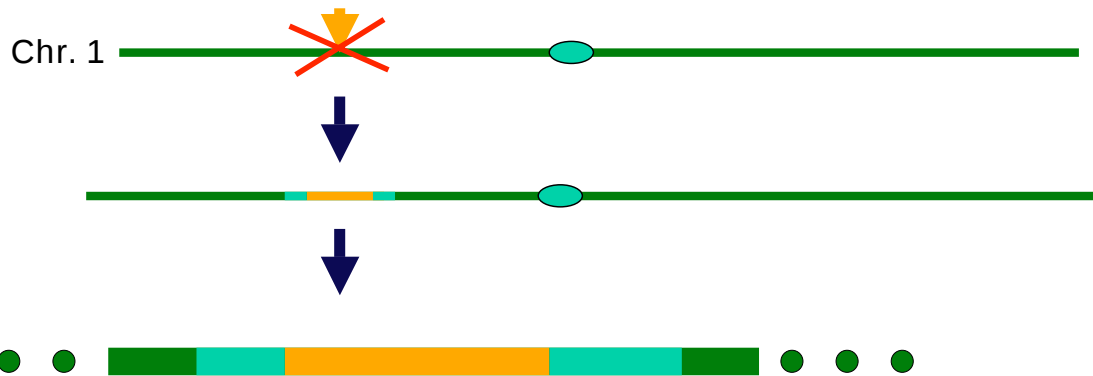


Kann man das betroffene Gen
problemlos identifizieren ?



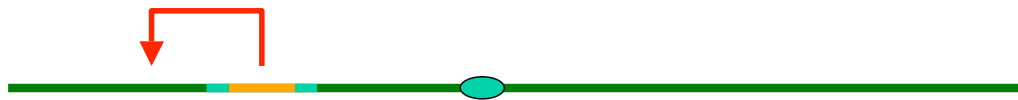
Herstellung von Mutantenbanken

Ja: z.B. durch inverse PCR
oder durch Tail-PCR



Herstellung von Mutantenbanken

- Ähnliche Mechanismen sind auch durch die Insertion eines Transposons möglich:
- Vorteil: kann mobilisiert werden;



- Nachteil: ist nicht unbedingt stabil;



Herstellung von Mutantenbanken

Weltweit sind ca. 300.000 T-DNA oder
Transposon-Mutanten von Arabidopsis
In Datenbanken verfügbar;

Eingeben der Gensequenz in den
Computer identifiziert eine möglicher-
Weise vorhandene Mutante in Sekunden;

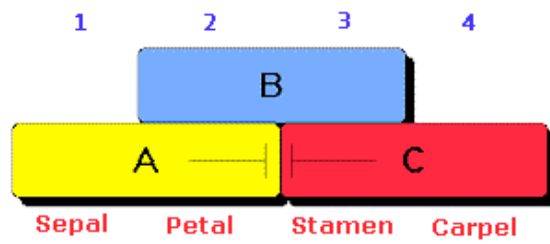


Identifizierung von Promotoren

- Insertion von promotorlosen Reportergenen;
- Expression des Gens findet nur statt, wenn es hinter einem Promotor inseriert wird;
- —→ Auffinden von Promotoren für bestimmte Expressionszwecke etc.;

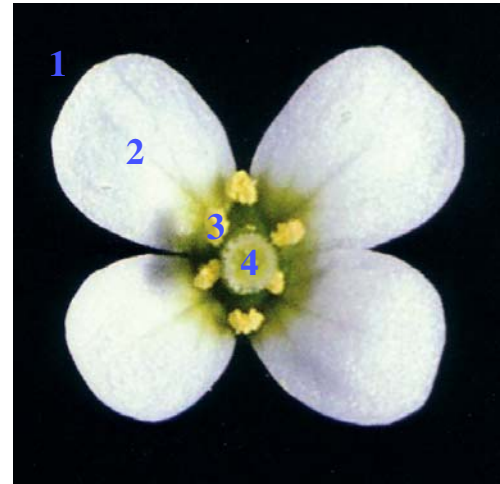


Regulation der Blütenbildung



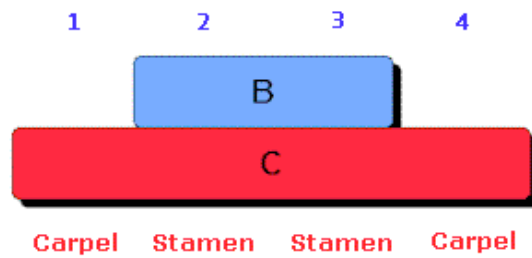
Floral identity genes

- A: *apetala1*
B: *apetala3* und *pistillata*
C: *agamous*



Kopplung der drei Gene bestimmt, was auch Zellen bzw. Blättern wird!

Regulation der Blütenbildung

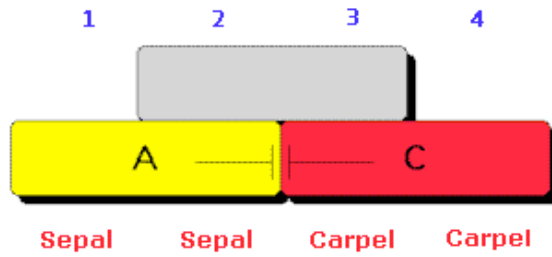


apetala1

Bestimmt die Identität der Blütenknospe und die Entwicklung von Kelch- und Blütenblättern;



Regulation der Blütenbildung



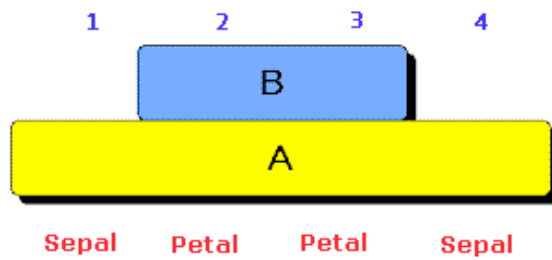
apetala3 und *pistillata*

Steuern die Entwicklung von
Blüten- und Staubblättern;

apetala3 Mutanten →



Regulation der Blütenbildung

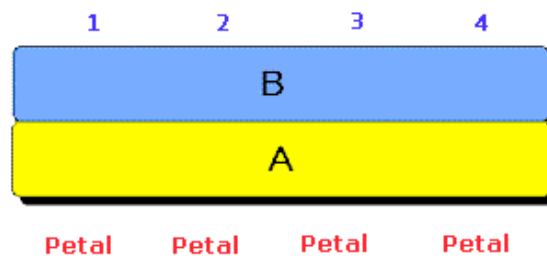


agamous

Steuert in Kombination mit
oder ohne *apetala3* / *pistillata*
die Identität der Sexualorgane



Regulation der Blütenbildung



Regulation der Blütenbildung

Wie sieht eine 3-fach Mutation
in A, B und C aus?



Dreifachmutation in A, B und C: es entsteht ein einfaches Laubblatt