

**Etablierung eines Transformationssystems für
die Körnerleguminose *Vicia faba* (L.) zur
Modifizierung der Aminosäurezusammensetzung
im Samen**

Dissertation

**eingereicht am
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin
(Institut für Angewandte Genetik)**

**von
Petra Böttinger
aus Esslingen**

Berlin 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling, Freie Universität Berlin

2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Kurt Zoglauer, Humboldt-Universität zu Berlin

Tag der Disputation: 2. September 2004

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	IV
VERZEICHNIS DER TABELLEN	V
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	VI
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 AGRONOMISCHE BEDEUTUNG VON LEGUMINOSEN	1
1.2 <i>VICIA FABA</i>	2
1.3 ZÜCHTUNGSZIELE	3
1.4 GENTECHNISCHE VERFAHREN IN DER PFLANZENZÜCHTUNG	4
1.5 GEWEBEKULTUR UND TRANSFORMATION BEI <i>VICIA FABA</i>	6
1.6 MODIFIZIERUNG DER AMINOSÄURENZUSAMMENSETZUNG IN SAMEN VON KÖRNERLEGUMINOSEN ..	9
1.7 STRATEGIEN ZUR VERÄNDERUNG DES AMINOSÄUREPROFILS	9
1.8 AUFGABENSTELLUNG	13
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 MATERIAL	15
2.1.1 PFLANZENMATERIAL	15
2.1.2 BAKTERIEN	15
2.1.3 CHEMIKALIEN UND MEDIENZUSÄTZE	15
2.1.4 PLASMIDE	16
2.1.5 PCR-PRIMER	17
2.1.6 ANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNODETEKTION	17
2.2 METHODEN	18
2.2.1 GEWEBEKULTUR UND TRANSFORMATION	18
2.2.1.1 ANZUCHT DER PFLANZEN ZUR EXPLANTATGEWINNUNG	18
2.2.1.2 MEDIEN UND KULTURBEDINGUNGEN	18
2.2.1.3 INOKULATION UND KOKULTUR	21
2.2.1.4 SELEKTION UND PFLANZENREGENERATION	21
2.2.1.5 GEWÄCHSHAUSBEDINGUNGEN UND „TRIPPEN“	22
2.2.2 CYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	22
2.2.2.1 MATERIALGEWINNUNG	22
2.2.2.2 CHROMOSOMENPRÄPARATION FÜR DIE LICHTMIKROSKOPIE	22
2.2.2.3 CHROMOSOMENAUFBEREITUNG FÜR DIE <i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG	23
2.2.2.4 SONDENHERSTELLUNG UND - MARKIERUNG	23
2.2.2.5 FLUORESCENZ- <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG (FISH)	23
2.2.2.6 FLOW CYTOMETRY	24
2.2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN ZUR ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN	24
2.2.3.1 ISOLIERUNG VON DNA AUS PFLANZENMATERIAL	24

2.2.3.2	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	25
2.2.3.3	SOUTHERN BLOT ANALYSE.....	25
2.2.3.4	ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS UNREIFEN SAMEN	25
2.2.3.5	REVERSE TRANSKRIPTION UND RT-PCR.....	26
2.2.4	PROTEINANALYSEN UND ENZYMASSAYS	26
2.2.4.1	PROTEINEXTRAKTION AUS SAMEN UND PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	26
2.2.4.2	POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	26
2.2.4.3	ANALYSE VON PROTEINMUSTERN DURCH IMMUNODETEKTION (WESTERN BLOT).....	27
2.2.4.4	AK-ASSAY ZUM NACHWEIS DER ASPARTATKINASE-AKTIVITÄT.....	27
2.2.4.5	HISTOCHEMISCHER GUS-ASSAY	27
2.2.4.6	PAT-ASSAY ZUM NACHWEIS DER PHOSPHINOTRICIN-ACETYLTRANSFERASE	28
2.2.5	AMINOSÄUREN-ANALYSEN	28
2.2.5.1	ANALYSE FREIER AMINOSÄUREN	28
2.2.5.1.1	EXTRAKTION FREIER AMINOSÄUREN AUS REIFEN SAMEN VON <i>VICIA FABA</i>	28
2.2.5.1.2	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DES GEHALTS AN FREIEN AMINOSÄUREN.....	29
2.2.5.1.3	HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITS-CHROMATOGRAPHIE (HPLC).....	29
2.2.5.2	ANALYSE PROTEINGEBUNDENER AMINOSÄUREN	29
3	ERGEBNISSE.....	31
3.1	VERSUCHE ZUR <i>IN VITRO</i> -KULTUR UND SPROBREGENERATION.....	31
3.1.1	SPROBREGENERATION MIT UND OHNE KALLUSPHASE	31
3.1.2	EINFLUß UNTERSCHIEDLICHER BASALMEDIEN (MS VS. KM).....	34
3.1.3	EINFLUß VERSCHIEDENER HORMONKONZENTRATIONEN IN PHASE II	34
3.1.4	WIRKUNG VON CASEINHYDROLYSAT UND KOKOSWASSER	35
3.1.5	REAKTION UNTERSCHIEDLICHER EXPLANTATE	36
3.2	TRANSFORMATION VON <i>VICIA FABA</i>	37
3.2.1	INOKULATION/KOKULTUR MIT <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	38
3.2.2	SELEKTION MIT KANAMYCIN UND PHOSPHINOTHRICIN	40
3.2.3	SPROBREGENERATION IN PHASE II	42
3.2.4	SPROBVERMEHRUNG UND – ELONGATION (PHASE III).....	44
3.2.5	PFROPFEN UND BEWURZELUNG (PHASE IV).....	46
3.3	CHARAKTERISIERUNG DER TRANSFORMANDEN.....	47
3.3.1	MORPHOLOGIE DER PRIMÄRTRANSFORMANDEN	47
3.3.2	CYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	49
3.3.2.1	ERGEBNISSE DER <i>FLOW CYTOMETRY</i>	49
3.3.2.2	BEFUNDE DER LICHTMIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNGEN.....	51
3.3.3	SOUTHERN BLOT ANALYSE DER T ₀ /T ₁ - PFLANZENGENERATION.....	52
3.3.4	PCR ANALYSEN DER NACHKOMMENSCHAFT TRANSGENER LINIEN	53
3.3.5	CYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN DER LINIEN 12-1 UND 12-2: FLUORESCENZ- <i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG (FISH)	55
3.3.6	EXPRESSIONSANALYSEN	58
3.3.6.1.	ANALYSE DER GUS – EXPRESSION IN LINIE A13	58

3.3.6.2 NACHWEIS DER AKTIVITÄT DES 2S-ALBUMIN 8-GENS (<i>SFA8</i>)	59
3.3.6.2.1 ANALYSE DER TRANSKRIPTIONSAKTIVITÄT ÜBER RT-PCR	59
3.3.6.2.2 WESTERN BLOT ANALYSE DER <i>SFA8</i> -LINIEN.....	60
3.3.6.3 NACHWEIS DER GENEXPRESSION VON <i>LYSC</i> IN DEN AK-LINIEN	61
3.3.6.3.1 NACHWEIS DER BAKTERIELLEN ASPARTATKINASE DURCH WESTERN BLOT ANALYSE	61
3.3.6.3.2 DARSTELLUNG DER ASPARTAT KINASE AKTIVITÄT (AK-ASSAY)	63
3.3.7 ZUSAMMENFASSUNG DER ETABLIERTEN LINIEN UND IHRER EIGENSCHAFTEN	64
3.4 MODIFIZIERUNG DER AMINOSÄURENZUSAMMENSETZUNG IN DEN SAMEN	65
3.4.1 FREIE AMINOSÄUREN IN SAMEN DER LINIEN 12-2 UND 12-40	65
3.4.2 PROTEINGEBUNDENE AMINOSÄUREN IN DEN SAMEN DER LINIEN 8-5, 12-1 UND 12-2	67
4 DISKUSSION	69
4.1 ENTWICKLUNG DES TRANSFORMATIONSSYSTEMS.....	70
4.1.1 GENTRANSFER MIT <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	70
4.1.2 EINSATZ VON ANTIBIOTIKA ZUR SELEKTION UND ZUR ELIMINIERUNG DER AGROBAKTERIEN	71
4.1.3 NUTZUNG DES <i>BAR</i> -GENS ALS SELEKTIONSMARKER.....	72
4.1.4 <i>AGROBACTERIUM</i> VS. <i>PARTICLE GUN</i>	73
4.2 EIGENSCHAFTEN DES REGENERATIONSSYSTEMS.....	74
4.2.1 REGENERATIONSSYSTEME MIT „EINFACHEN“ ODER „KOMPLEXEN“ GEWEBEN.....	74
4.2.2 VERWENDUNG UND WIRKUNG VON TDZ	75
4.2.3 WIRKUNG VON CASEINHYDROLYSAT UND KOKOSWASSER	76
4.2.4 EFFEKTE DES BASISMEDIUMS UND DER KOHLENSTOFFQUELLE AUF DIE SPROBBILDUNG.....	78
4.3 GENETISCHE UND PHÄNOTYPISCHE VERÄNDERUNGEN IN DEN TRANSGENEN LINIEN	78
4.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR INTEGRATION UND EXPRESSION DER FREMDGENE	80
4.5 ERHÖHUNG DES METHIONINGEHALTS IN SAMEN VON <i>VICIA FABA</i>	83
4.5.1 METHIONINREICHE SPEICHERPROTEINE.....	83
4.5.2 DEREGULIERUNG DES ASPARTATSTOFFWECHSELS	85
4.6 AUSBLICK	87
5 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	89
6 LITERATURVERZEICHNIS	91
7 ANHANG.....	111
EIGENE, FÜR DIE ARBEIT RELEVANTE PUBLIKATIONEN.....	115

Danksagung

Herrn Prof. Dr. O. Schieder[†], in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit begonnen wurde, möchte ich für die Bereitstellung des Themas und seine stetige Unterstützung in dieser Zeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Schmülling für seine Bereitschaft, die Begutachtung und Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie zu übernehmen. Ebenfalls herzlichen Dank an Herr PD Dr. K. Zoglauer, Humboldt Universität Berlin, für seine freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. R. Snowdon, Justus Liebig-Universität Giessen, möchte ich für die Möglichkeit danken, in seinem Labor und mit seiner Unterstützung die FISH-Technik kennenzulernen. Für die Überlassung des AK-Konstrukts möchte ich Herrn Prof. G. Galili, Weizman Institut, Rehovot, Israel danken, ebenso Herrn Dr. M. Meixner (ehem. Angewandte Genetik, FU Berlin) für die Bereitstellung der SFA8-Vektoren. Für die Durchführung von Western Blot-Analysen mit den SFA8-Linien danke ich Herrn Dr. H. Schroeder, CSIRO, Canberra, Australien.

Danke an Wolf-Henning Kusber, BGBM und Dr. Renate Krätke, BfR für die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Für die Unterstützung bei Layout und Bildbearbeitungen möchte ich mich bei Dr. Thomas Pickardt bedanken. Herzlichen Dank auch an Simona Hennig und Anke Steinmetz, die mit ihrem Engagement während ihrer Examensarbeiten ihren Beitrag zur Durchführung dieser Arbeit geleistet haben. Nicht zu vergessen Dr. Dirk Enneking, für seine ansteckende Begeisterung für *Vicia* und seine Diskussionsfreudigkeit.

Dank auch an die Mitarbeiter(innen) des Instituts für Angewandte Genetik, die alle auf ihre Weise zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, insbesondere die Leguminosengruppe (Doro, Schokoufeh, Stefan, Clemens,... und alle anderen natürlich auch).

Danke an Gaby, Andi, Dorothee, die WILMAs, Monika, Till und Timon für grosse und kleine Hilfen.

Die Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde durch ein Stipendium zur Förderung des Wissenschaftlichen Nachwuchses (NaFöG) der Freien Universität Berlin und die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

Der Abschluss der Dissertation wurde ermöglicht durch ein Abschluss-Stipendium des Berliner Programms zur Förderung der Chancengleichheit von Frauen in Forschung und Lehre.

Verzeichnis der Tabellen

	Seite	
Tab. 1.1	Transgene Körnerleguminosen, nach Somers <i>et al.</i> (2003)	8
Tab. 2.1	Liste der Binärvektoren	17
Tab. 2.2	Verzeichnis der PCR Primer	17
Tab. 2.3	Medien zur direkten Sproßregeneration	19
Tab. 2.4	Medien zur Kallusinduktion	20
Tab. 2.5	Kulturmedien zur Sproßinduktion nach einer Kallusphase	20
Tab. 3.1	Einfluss der Dauer der Kallusphase (I) auf die Induktion von Sprossen in Kulturphase II	33
Tab. 3.2	Vergleich der Sproßregeneration auf unterschiedlichen Basal-Medien (MS und KM)	34
Tab. 3.3	Auswirkung erhöhter TDZ-Konzentrationen auf die Sproßbildung in Phase II	35
Tab. 3.4	Auswirkung komplexer Zusätze (Caseinhydrolysat, Kokoswasser) zum Kallusinduktionsmedium (TNZ) auf die Sproßbildung bei <i>Vicia faba</i> cv. Mythos und Albatross	36
Tab. 3.5	Standard-Medien des Arbeitsprotokolls für die genetische Transformation von <i>Vicia faba</i>	38
Tab. 3.6	Einfluss des Alters der zur Explantatgewinnung verwendeten Keimlinge auf die Transformationsrate	39
Tab. 3.7	Zusammenfassung der durchgeführten Transformationen	43
Tab. 3.8	Verzeichnis der aus den Transformationsexperimenten hervorgegangenen, zur Weiterkultur geeigneten Klone	46
Tab. 3.9	PCR Analyse der Nachkommenschaft transgener Linien	55
Tab. 3.10	Zusammenfassung der Linien und ihrer morphologischen, cytologischen sowie molekularbiologischen Charakteristika	64
Tab. 3.11	Bestimmung der Anteile freier Aminosäuren am Aminosäuregesamtgehalt durch HPLC in je 2 Einzelsamen des Wildtyps und den transgenen Linien 12-2 und 12-40	66
Tab. 3.12	Profil der proteingebundenen Aminosäuren in reifen Samen von Kontrollpflanzen und transgenen Linien von <i>Vicia faba</i>	67
Tab. 7.1	Medienscreening zur <i>de novo</i> Sproßregeneration bei <i>Vicia faba</i>	111

Verzeichnis der Abbildungen

	Seite
Abb. 1.1 <i>Feedback</i> Hemmung der Aspartatkinase durch die Endprodukte Lysin und Threonin im Biosyntheseweg der Aminosäuren der Aspartatfamilie	11
Abb. 3.1 Darstellung der Kulturphasen des <i>de novo</i> Regenerationsprotokolls von <i>Vicia faba</i>	37
Abb. 3.2 Analyse resistenter Kallusse mittels GUS- oder PAT-Assay	41
Abb. 3.3 Darstellung der Kulturphasen des Transformationssystems bei <i>Vicia faba</i>	45
Abb. 3.4 Morphologie aberranter Phänotypen transgener Linien von <i>Vicia faba</i>	48
Abb. 3.5 DNA-Histogramme transgener Linien und WT-Pflanzen	50
Abb. 3.6 Metaphasestadien tetraploider <i>Vicia faba</i> - Linien	51
Abb. 3.7 Southern Blot Analyse transgener Pflanzen mit einer Digoxigenin-markierten, <i>nptII</i> -spezifischen Sonde	52
Abb. 3.8 Schematische Darstellung der T-DNA Bereiche der Vektoren pGSGluc1, pBIOU und pAN109	54
Abb. 3.9 PCR Analyse genomischer DNA der Linien 8-5 und 12-2 zum Nachweis der Gene <i>sfa8</i> bzw. <i>lysC</i>	54
Abb. 3.10 Restriktionsverdau der T-DNA von pAN109 zur Überprüfung der Sequenzidentität für die Sondenherstellung	56
Abb. 3.11 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung des 8 kb großen T-DNA Inserts in Chromosomen der Linien 12-1 und 12-2	57
Abb. 3.12 Histologischer GUS-Assay der <i>uidA</i> -Expression bei Linie A13	59
Abb. 3.13 Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der Linie 8-5	60
Abb. 3.14 Immunodetektion des Sonnenblumen 2S-Albumins in den Linien 8-5 und 8-66	61
Abb. 3.15 Western Blot Analyse zum Nachweis der Expression der bakteriellen Aspartatkinase (<i>lysC</i>) aus <i>E. coli</i> in den Linien 12-1, 12-2 und 12-40	62
Abb. 3.16 Bestimmung der Aspartatkinase-Aktivität in Einzelsamen der Linien 12-1, 12-2 und 12-40 mittels enzymatischen AK-Assay	63

Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
<i>A. bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
AK	Aspartatkinase
BAP	Benzylaminopurin
<i>bar</i>	<i>Bialaphos resistance</i> (Resistenzgen aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i>)
BNG	Brasilnußgen (Paranuß)
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CaMV 35S	35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus
Caseinh.	Caseinhydrolysat
CCD	<i>charged coupled device</i>
cDNA	komplementäre DNA
CTAB	Cetyltrimethyl-ammoniumbromid
cv.	Kultivar (Ökotyp)
CY3	Fluorochrom (2-Amino-3-Mercapto-Propionamid)
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4´6-Diamidino-2-Phenylindol
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DEPC	Diethyl-pyrocyanat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,1-Bis(p-Chlorophenyl)-2,2,2-trichlorethan
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ("und andere")
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
i. d. R.	in der Regel
IBA	Indolylbuttersäure
k	Kilo
Kb	Kilobasenpaare
KD	Kilodalton
KES	Karminessigsäure
KM-Medium	Medium nach Kao & Michayluk (1975)
Km	Kanamycin
l	Liter

LB/RB	linke/rechte Bordersequenz der T-DNA
LB-Medium	Medium nach Luria Bertani
M	Molarität
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS-Medium	Medium nach Murashige & Skoog (1962)
NAA	Naphtylessigsäure
nos	Nopalinsynthase
NPTII	Neomycinphosphotransferase II
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAT	Phosphinotricin Acetyltransferase
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEV	<i>position effect variegation</i>
Picloram	4-Amino-3,5,6-trichlorpicolinsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
PPT	Phosphinotricin
PTGS	<i>posttranscriptional gene silencing</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SFA8	<i>Sunflower Albumin 8</i>
SSC	<i>standard saline citrat</i>
T ₀ , T ₁	primäre bzw. erste Filial-Transformandengeneration
Tab.	Tabelle
T-DNA	transferierte DNA
TDZ	Thidiazuron (1-Phenyl- <i>N'</i> -(1,2,3-thiadiazol-yl)urea)
TGS	<i>transcriptional gene silencing</i>
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Threoninsynthase
U	<i>Units</i> (Einheit der Enzymaktivität)
u. a.	unter anderem
<i>uidA</i>	Gen der β -Glucuronidase
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehung pro Minute
v/v	<i>Volume per volume</i>
w/v	<i>Weight per volume</i>
WT	Wildtyp
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-Indol- β -D-Glucuronsäure
xg	mal Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
μ g	Mikrogramm