

8 Anhang

8.1 Konstruktion transgener *SQDI*-Pflanzen

Mutagenese und ein dadurch entstehender Phänotyp eines Organismus kann Aufschluß über die Funktion eines betroffenen Gens geben. Die Erzeugung von Mutanten durch gezielten Genaustausch ist in Prokaryoten und einfachen Eukaryoten ein etabliertes Verfahren. So können beispielsweise sogenannte *Knock-out* Mäuse durch gezielten Genaustausch mit Hilfe embryonaler Stammzellen erzeugt werden. Bei höheren Pflanzen ist dieser Ansatz durch den experimentellen Aufwand, den die Selektion pflanzlicher Mutanten darstellt, bislang nur beschränkt anwendbar. Pflanzliche Mutanten lassen sich durch Konstruktion transgener Pflanzen mit Hilfe der *antisense*-Technik oder durch Überexpression des endogenen Gens - was dann zum Phänomen der Co-suppression führen kann - gewinnen. In beiden Fällen handelt es sich jedoch um keine *knock-out*, sondern um 'graduelle' Mutationen. Die Expression eines Gens in *antisense*-Orientierung, wie auch die Überexpression, kann zu einer Reduktion des entsprechenden Genproduktes führen und daher zur Analyse seiner Funktion angewandt werden.

Als weitere Möglichkeit, die Funktion von Genen in Pflanzen zu untersuchen, hat sich in jüngster Zeit vor allem bei *Arabidopsis* die Suche nach *knockout*-Mutanten etabliert. Dieser Ansatz, der ursprünglich für *Drosophila melanogaster* (Ballinger & Benzer, 1993) sowie *Caenorhabditis elegans* entwickelt wurde, hat den Vorteil, daß das Gen völlig ausgeschaltet ist, wohingegen in *antisense*-Pflanzen die Möglichkeit einer restlichen Enzymaktivität nie ausgeschlossen werden kann. Wie schon erwähnt ist dieses Verfahren sehr aufwendig, da bisher das Ausschalten eines Gens vor allem durch zufällige chemische Mutagenese oder zufällige Insertion von T-DNA ins Genom möglich war. In beiden Fällen muß eine große Anzahl von Pflanzen untersucht werden um eine gewünschte Mutante zu finden. Man geht davon aus, daß das Genom von *Arabidopsis* 120 Mb beträgt und für etwa 20000 Gene kodiert. Das *screenen* von sogenannten T-DNA Linien hat den Vorteil, daß nach Identifikation einer gesuchten Mutante die Charakterisierung des betroffenen Gens stark erleichtert wird.

Eine weitere Möglichkeit *Knock-out*-Mutanten zu erzeugen ist durch Homologe Rekombination. Im Prinzip sollte dieses Verfahren dem bei Bakterien oder Mäusen ähneln, bei Pflanzen hat sich dieser Ansatz aus bisher noch nicht verstandenen Gründen jedoch als deutlich schwieriger herausgestellt. Bisher ist einmal von der erfolgreichen Isolierung einer

pflanzlichen Mutanten über Homologe Rekombination berichtet worden (Kempin *et al.*, 1997).

8.2 Überexpression in Arabidopsis

Das Experiment der Überexpression des *SQDI*-Gens sollte einerseits dazu dienen, Mutanten in *Arabidopsis* zu finden, die durch Cosuppression des Gens weniger Sulfolipid enthalten und so für eine physiologische Untersuchung der Rolle von Sulfolipid in Pflanzen zur Verfügung stehen. Andererseits sollte mit dem Experiment untersucht werden, ob *SQDI* eventuell den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Sulfolipidbiosynthese katalysiert, denn dann müßte bei tatsächlicher Überexpression mehr SQDG in der Pflanze zu finden sein. Das *sense*-Konstrukt wurde folgender Maßen kloniert: Ein 1790 bp langes cDNA-Insert, welches das vollständige *SQDI*-Gen mit der Signalsequenz enthielt, wurde über die im pZL1 Polylinker enthaltenen Schnittstellen Kpn I und Xba I ausgeschnitten, in pBS subkloniert und mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen binären Vektor pBinAR ligiert. In dem als pBinAR-*SQDI-sense* bezeichneten Plasmid steht das Konstrukt unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors (CaMV, Blumenkohlmosaikvirus), der in fast allen Zelltypen einer Pflanze konstitutiv aktiv ist (Abb. 8-1).

Das so erhaltene Konstrukt pBinAr-*SQDI-sense* wurde durch Elektroporation in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1[pGV2260] eingebracht, und anschließend wurde *Arabidopsis* via Vakuum Infiltration bzw. Tabak über Blattscheiben transformiert. Die Selektion der entsprechenden Transformanten ist noch nicht abgeschlossen.

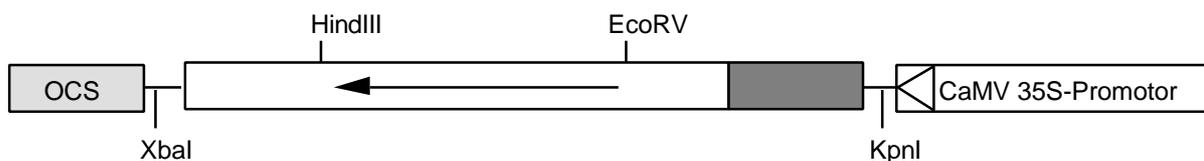


Abb. 3-3 : *SQDI* Überexpressions-Konstrukt

Der linke Kasten mit der Pfeilspitze steht für den CaMV 35S-Promotor und seine Orientierung. Der graue Kasten zeigt den für das Transitpeptid kodierenden Bereich, die vollständige cDNA ist in *sense* Richtung kloniert, OCS entspricht auch hier dem 3' Ende des Octopinsynthasegens von *Agrobacterium tumefaciens*.

8.3 Gen *Knock-out* in *Arabidopsis*

8.3.1 *Knock-out* durch Homologe Rekombination

Zur Herstellung von Pflanzen, in denen das *SQD1*-Gen über Homologe Rekombination ausgeschaltet werden sollte, wurde folgendes Konstrukt kloniert.

Man geht davon aus, daß Homologe Rekombination durch zweifaches *crossing over* stattfindet. Um die Wahrscheinlichkeit dieses Ereignisses zu erhöhen, aber andererseits ein doppeltes *crossing over* auf einer Seite zu vermeiden, wurden beidseitig des Selektionsmarkers jeweils 3-3,5 kB lange genomische DNA-Fragmente kloniert. Dafür wurde eine Cosmidbank von genomischer DNA nach einem entsprechenden Klon durchsucht, der Klon wurde über Restriktionsanalyse charakterisiert und die entsprechenden DNA-Fragmente in der KO-Vektor (Miao & Lamm, 1995) kloniert. Es folgten die Transformation des Konstrukts in Agrobakterium und anschließend Transformation von *Arabidopsis* via Vakuum-Infiltration.

In dem bisher einzigen Bericht einer erfolgreichen Homologen Rekombination wurde eine Rekombinationsfrequenz von einem pro 1000 transformierten Samen errechnet. Um mindestens die gleiche Anzahl an Samen zu erreichen wurden 10 000 *Arabidopsis* Pflanzen transformiert von denen 50 Mio. Samen geerntet wurden. Die Transformationsrate bei diesem Konstrukt lag etwa bei 1:1000 bis 1:5000, so daß mit mindestens 10 000 Transformanten gerechnet werden kann. Die Selektion erfolgte durch Ausplattieren der Samen auf Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum. Bisher wurden 50 Transformanten auf Gus-Aktivität getestet und über PCR auf Insertion in *SQD1* untersucht (Miao & Lamm, 1995), jedoch konnte noch keine *Knock-out* Pflanze identifiziert werden.

Knock-out Konstrukt

Für die Klonierung des *SQD1* Knock-out Konstruktes wurde der von Miao & Lamm (1995) hergestellte KO-Vektor genutzt. Zuerst wurde eine genomische Cosmid-Bank (von E. Grill) mit dem *SQD1*-PCR Fragment als Sonde, durchsucht (Abb. 8-2 A). Die Herstellung der Bank erfolgte durch partiellen Verdau genomischer *Arabidopsis* DNA mit HindIII. Die Charakterisierung eines entsprechenden Cosmids (~20 kB) erfolgte mittels Restriktions- und Southern-Analyse. Anschließend wurden die zwei hintereinanderliegenden Cosmidstücke (je 3 und 3,2 kB) auf denen das *SQD1* Gen kodiert über HindIII Schnittstellen in pBS II KS⁺ subkloniert (Abb. 8-3 B). Im letzten Schritt wurden die je 3 und 3,2 kB großen Cosmidstücke in den KO-Vektor kloniert und die Orientierung wieder mittels Restriktions- und Southern-Analyse bestätigt. Das vordere Cosmid-Fragment konnte in den KO-Vektor über SacI-XhoI, das hintere Fragment über Sall-BamHI in die entsprechenden Schnittstellen inseriert werden (Abb. 8-3 C).

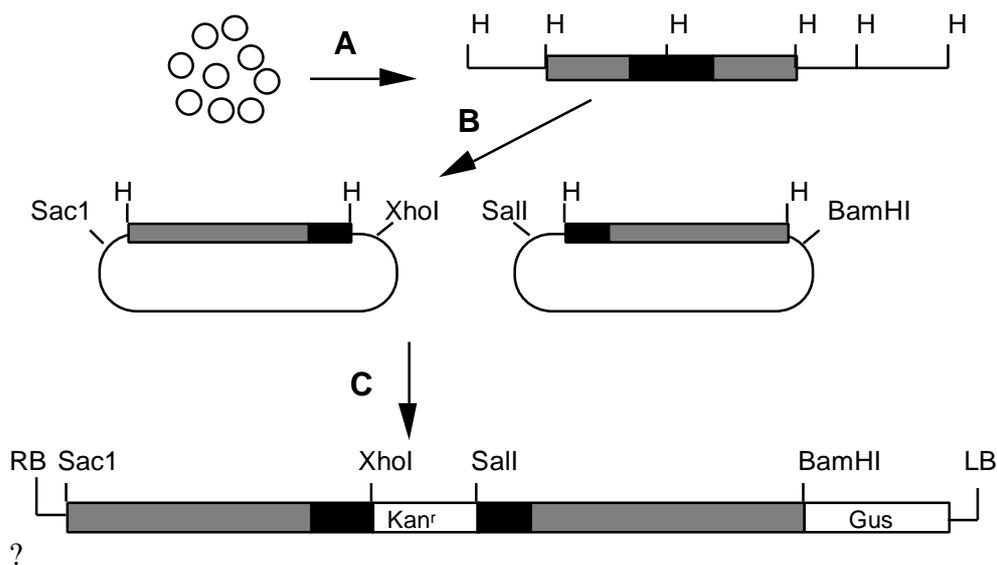


Abb. 3-4 : Strategie der Klonierung des *SQD1* KO-Konstrukts

A, Durchsuchen einer Cosmidbank. B, Charakterisierung und Klonierung geeigneter Cosmid-Fragmente. C, Insertion der Fragmente in den KO-Vektor. H, HindIII; RB, right border; LB, left border; Kan^r , Kanamycin Resistenz Marker, Gus, β -Glucoronidase Marker

8.3.2 *Knock-out* durch T-DNA Insertion

Ein weiterer Ansatz, Mutanten in denen ein Gen völlig ausgeschaltet ist zu erhalten ist das Durchsuchen von sogenannten T-DNA Linien (Transfer-DNA). T-DNA Linien sind Mutanten-Linien, in denen T-DNA zufällig, aber stabil in das Genom der Pflanze inseriert wurde. Trifft diese T-DNA zufällig in ein Gen wird dieses ausgeschaltet. Im Falle von *Arabidopsis* sind ganze Kollektionen von T-DNA Linien vorhanden.

Das *screenen* dieser Linien erfolgt ähnlich den der *Knock-out* Linien über PCR. Hierfür wurden zwei DNA-pools die jeweils 6000 Linien T-DNA getaggtter *Arabidopsis* Pflanzen untersucht (erhalten vom Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University). Die Wahrscheinlichkeit in diesen DNA-pools ein Linie zu finden in der das gewünschte Gen ausgeschaltet ist sollte bei etwa 30% liegen. Auch in diesem Ansatz konnte noch keine *SQDI-Knock-out* Linie identifiziert werden.