

Die Untersuchung der pflanzlichen Organellentranskription
am Beispiel der kernkodierten RNA-Polymerasen in
Arabidopsis thaliana

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sarah-Sophia Nicola Hensel

aus Berlin

Berlin, 2004

1. Gutachter: PD Dr. Wolfgang Schuster

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling

Tag der Disputation: 16.07.2004

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Evangelischen Studienwerk Villigst e.V. gefördert.

Inhalt

Abkürzungen.....	IV
1 Einleitung.....	1
Ziel der vorliegenden Arbeit.....	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Chemikalien.....	16
2.1.2 Stammlösungen.....	16
2.1.2.1 Antibiotika.....	16
2.1.2.2 Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen.....	16
2.1.2.3 Nährmedien.....	18
2.1.3 Synthetische Oligonukleotide.....	19
2.1.4 Enzyme.....	19
2.1.5 Kits.....	19
2.1.6 Geräte.....	19
2.1.7 DNA-Marker.....	20
2.1.8 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.9 Ausgangsvektoren.....	20
2.1.10 Pflanzenmaterial.....	20
2.1.10.1 Pikier/ <i>Arabidopsis</i> -Erde.....	21
2.1.11 Bakterienstämme.....	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Herstellung von <i>Antisense</i> - und <i>Sense</i> -Konstrukten.....	22
2.2.1.1 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	22
2.2.1.2 <i>Inverse</i> PCR.....	23
2.2.1.3 Ligation von PCR-Produkten mittels TA-Cloning Kit.....	23
2.2.1.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mittels SAP.....	24
2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten.....	24
2.2.1.6 Plasmid-DNA Mini-Präparation nach Birnboim und Doly (1979).....	24
2.2.2 Klonierung von binären Vektoren zur Pflanzentransformation.....	25
2.2.2.1 Herstellung eines binären Klonierungsvektors mit Polylinkersite.....	25
2.2.2.2 Plasmid-DNA-Maxi-Präparation.....	25
2.2.2.3 DNA-Sequenzierung nach Sanger <i>et al.</i> (1977).....	25
2.2.2.4 Herstellung und Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	26
2.2.2.5 Herstellung und Transformation kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen.....	27

2.2.3	Anzucht von Pflanzen.....	28
2.2.4	Herstellung einer Agrobakterien-Suspension für die <i>in planta</i> -Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
2.2.5	<i>In planta</i> -Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
2.2.6	<i>In vitro</i> -Selektion von transgenen Pflanzen.....	29
2.2.7	Analyse der transgenen Pflanzen.....	29
2.2.7.1	Extraktion genomischer Pflanzen-DNA mittels CTAB-Methode	29
2.2.7.2	PCR-Untersuchung auf Markergen-Integration.....	30
2.2.7.3	Southern Blot-Untersuchung auf T-DNA-Integration und Kopienanzahl.....	30
2.2.7.4	Herstellung einer Dig-markierten Sonde	31
2.2.7.5	Bestimmung der Markierungseffizienz mittels Dot Blot.....	31
2.2.7.6	Hybridisierung, Waschen und Detektion.....	31
2.2.7.6.1	Rehybridisierung	32
2.2.7.7	Gesamt-RNA-Extraktion	33
2.2.7.8	mRNA-Aufreinigung.....	33
2.2.7.9	Erst-Strang-cDNA-Synthese.....	34
2.2.7.10	Quantitative RT-PCR.....	34
2.2.7.11	RNA-Editing-Untersuchung mittels Hot-Shot-Sequenzierung.....	35
2.2.8	Wurzellängen-Test	35
2.2.9	Gekoppelte <i>in vitro</i> -Transkription und -Translation von RNA-Polymerase- Proteinen.....	35
2.2.10	Import von <i>in vitro</i> -translatierten RNA-Polymerase-Proteinen in Chloroplasten.....	36
2.2.11	Import von <i>in vitro</i> -translatierten RNA-Polymerase-Proteinen in Mitochondrien.....	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Klonierung kernkodierter RNA-Polymerasen vom Phagentyp aus <i>Arabidopsis thaliana</i> ..	38
3.2	Lokalisierung der Phagentyp-ähnlichen RNA-Polymerasen in der Zelle	43
3.2.1	<i>In Organello</i> -Import von <i>in vitro</i> -translatierten RNA-Polymerase-Proteinen	43
3.2.1.1	Import in Mitochondrien.....	44
3.2.1.2	Import in Chloroplasten	45
3.2.2	Lokalisierung der unterschiedlichen RNA-Polymerasen <i>in vivo</i> mit Hilfe von GFP- Fusionsproteinen	46
3.3	Klonierung von <i>Antisense</i> - und <i>Sense</i> -Konstrukten.....	50
3.3.1	Auswahl der Genabschnitte zur <i>Antisense</i> -/ <i>Sense</i> -Klonierung.....	51
3.3.2	Klonierung in pBinOligo und pBCM20	55
3.3.3	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> und Pflanzen	55
3.3.4	Selektion von Samen der T ₀ und nachfolgender Generationen.....	57
3.3.5	Untersuchung der transgenen Linien auf Integration der T-DNA.....	67

3.3.6	Kopienanzahl der T-DNA in transgenen Linien.....	68
3.4	Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der Transkriptmengen.....	72
3.5	Phänotypen und RNA-Editing.....	79
3.5.1	Untersuchung des plastidären und des mitochondrialen RNA-Editings.....	80
3.6	Untersuchung von RNA-Polymerasen-Insertionslinien.....	85
3.6.1	Untersuchung der Aufspaltung der Insertionslinien.....	86
3.6.2	Phänotyp der Insertionslinie Δ -RpoT;3.....	91
3.7	Bestimmung der Lage der single-copy T-DNA Insertion der transgenen Pflanzenlinie 2-5'-3-x mittels <i>inverser</i> PCR (IPCR).....	92
3.7.1	Untersuchung der Aufspaltung der Linie 2-5'-3-x.....	94
3.8	Untersuchung einer Insertionslinie für das Glutaminsäure-reiche Protein (E-rich protein).....	95
3.8.1	Untersuchung der Aufspaltung.....	96
4	Diskussion.....	98
4.1	Struktur Phagentyp-ähnlicher RNA-Polymerasen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	98
4.2	Lokalisierung der Genprodukte von <i>rpoT;1</i> , <i>rpoT;2</i> und <i>rpoT;3</i>	99
4.3	Einfluss von <i>Antisense</i> - und <i>Sense</i> -Konstrukten auf den Phänotyp.....	100
4.3.1	Keimungsraten und Wurzelwachstum.....	102
4.3.2	Pleiotrope Effekte im Phänotyp.....	104
4.4	Zusammenhang von T-DNA-Integration bzw. -Kopienanzahl und phänotypischen Auswirkungen.....	105
4.5	Bedeutung der Lage der single-copy T-DNA Insertion der transgenen Pflanzenlinie 2-5'-3-x.....	107
4.6	Eigenschaften einer T-DNA-Insertionslinie für das Glutaminsäure-reiche Protein (E-rich protein).....	107
4.7	Korrelation zwischen RNA-Polymerase-Transkription und phänotypischer Auswirkung.....	108
4.8	Untersuchung des RNA-Editings in transgenen Linien.....	110
4.8.1	Untersuchung des plastidären RNA-Editings.....	111
4.8.2	Untersuchung des mitochondrialen RNA-Editings.....	112
4.9	Charakterisierung von T-DNA-Insertionslinien für die kernkodierte RNA-Polymerase.....	113
5	Zusammenfassung.....	117
6	Summary.....	118
7	Literaturverzeichnis.....	119
8	Anhang.....	131
8.1	Synthetische Oligonukleotide.....	131
8.2	RNA-Polymerase-Sequenzen.....	133
8.3	Aminosäuresequenz-Vergleich der Gene At5g27330 und At3g05130.....	143