



Judith Köhler (Autor)

Entwicklung eines Screening-Systems zur Identifizierung und Evaluierung herbizidtoleranter 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen (HPPDs)

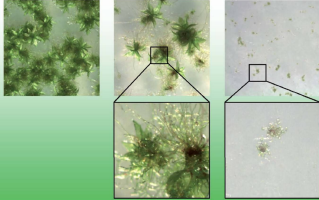
UNIVERSITÄT HOHENHEIM
SCHRIFTENREIHE ZUR PHYSIOLOGIE UND
BIOTECHNOLOGIE DER PFLANZEN



Judith Köhler

Entwicklung eines Screening-Systems zur Identifizierung
und Evaluierung herbizidtoleranter 4-Hydroxyphenylpyruvat
Dioxygenasen (HPPDs)

A. Schaller (Herausgeber) - Band 5



 Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6452>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	vii
Zusammenfassung	xi
Summary.....	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Herbizide in der modernen Landwirtschaft	1
1.2 Herbizidale HPPD-Inhibitoren und deren Zielprotein, die 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase	3
1.3 Bestehende Testsysteme zur Identifizierung und Evaluierung von HPPD-Inhibitor toleranten HPPDs	8
1.4 Das Testsystem Pflanze: Evaluierung von HPPD-Inhibitortoleranz im Zielorganismus	10
1.5 Photosynthetische Modellorganismen	13
1.5.1 Die Grünalgen <i>Chlorella vulgaris</i> und <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	14
1.5.2 Das Laubmoos <i>Physcomitrella patens</i>	15
1.6 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.2 Chemikalien und Kits	21
2.1.3 Herbizide	21
2.1.4 Biologisches Material	22
2.1.4.1 Bakterien.....	22
2.1.4.2 Grünalgen und Cyanobakterien	22
2.1.4.3 Laubmoos	22
2.1.5 Enzyme	23
2.1.6 Oligonukleotide	23
2.1.7 Vektoren	23
2.1.7.1 Kommerzielle Vektoren	23
2.1.7.2 DNA-Konstrukte	23
2.1.8 Verwendete Software und Datenbanken	24
2.1.8.1 DNA- und Proteinsequenzen.....	24
2.1.8.2 Auswertung von Wachstumsanalysen und statistische Auswertungen	24
2.2 Allgemeine Methoden	25



Inhaltsverzeichnis

2.2.1	Kultivierung und Transformation von Bakterien.....	25
2.2.2	Kultivierung von photosynthetisch aktiven Organismen.....	25
2.2.2.1	Kultivierung der Grünalgen <i>C. reinhardtii</i> und <i>C. vulgaris</i>	26
2.2.2.2	Kultivierung von <i>S. leopoliensis</i>	26
2.2.2.3	Kultivierung und Transformation von <i>P. patens</i>	26
2.2.2.3.1	Kultivierung	26
2.2.2.3.2	Transformation.....	27
2.2.3	Dosiswirkungsversuche an photosynthetisch aktiven Organismen	30
2.2.3.1	Dosiswirkungsversuche mit HPPD-Inhibitoren und weiteren Substanzen an <i>C. reinhardtii</i>	31
2.2.3.2	Dosiswirkungsversuche mit HPPD-Inhibitoren an <i>C. vulgaris</i>	31
2.2.3.3	Dosiswirkungsversuche mit HPPD-Inhibitoren an <i>S. leopoliensis</i>	32
2.2.3.4	Dosiswirkungsversuche mit HPPD-Inhibitoren an verschiedenen Gewebetypen von <i>P. patens</i>	32
2.2.3.4.1	Dosiswirkungsversuche mit Herbiziden an Protonema	32
2.2.3.4.2	Dosiswirkungsversuche mit Herbiziden an Gametophyten	33
2.2.3.4.3	Dosiswirkungsversuche mit Herbiziden an Protoplasten.....	33
2.2.4	Generierung einer tembotrionsensitiven <i>C. reinhardtii</i> -Mutante durch EMS- Mutagenese	34
2.2.5	Applikationsversuche mit isotopenmarkiertem Tembotrion an photosynthetisch aktiven Organismen	35
2.2.5.1	¹⁴ C-Tembotrionapplikation an <i>C. reinhardtii</i>	35
2.2.5.2	¹⁴ C-Tembotrionapplikation an <i>P. patens</i>	36
2.2.5.2.1	Radio-chemische Analysen mittels Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie	37
2.3	Molekularbiologische Methoden	38
2.3.1	Isolation und Quantifizierung von Nukleinsäuren	38
2.3.1.1	Isolation von Plasmid-DNA.....	38
2.3.1.2	Isolation von genomischer DNA aus <i>P. patens</i>	38
2.3.1.3	Isolation von RNA aus <i>P. patens</i>	38
2.3.1.4	cDNA-Synthese.....	38
2.3.1.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren	39
2.3.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren	39
2.3.2.1	Amplifikation.....	39
2.3.2.2	Restriktionsanalysen	40
2.3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese (qualitativ und präparativ).....	40



Inhaltsverzeichnis

2.3.2.4	Dephosphorylierung und Ligation.....	40
2.3.2.5	Sequenzierung	41
2.3.3	Vektorkonstruktion.....	41
2.3.3.1	Klonierung von <i>PpHpd1</i> und <i>PpHpd2</i> aus <i>P. patens</i>	41
2.3.3.2	<i>P. patens</i> -Transformationskonstrukte.....	41
2.3.3.2.1	Herstellung des Basiskonstrukts PpBV-1.....	42
2.3.3.2.2	Herstellung des Basiskonstrukts PpBV-2.....	42
2.3.3.2.3	<i>P. patens</i> -Transformationsvektoren mit zwei Targetsequenzen	43
2.3.3.2.4	<i>P. patens</i> -Transformationsvektoren mit einer Targetsequenz.....	43
2.4	Proteinbiochemische Methoden	45
2.4.1	Proteinexpression und -aufreinigung aus <i>E. coli</i>	45
2.4.2	Proteinaufreinigung aus <i>P. patens</i>	45
2.4.3	Auftrennung von Proteinen mittels Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese	46
2.4.4	Western Blot zur immunologischen Proteindetektion.....	46
2.4.5	Enzymaktivitätstest mit und ohne HPPD-Inhibitoren	47
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Identifizierung eines geeigneten Screening-Organismus	49
3.1.1	Die phänotypische Reaktion von potenziellen Screening-Organismen auf Tembotrion	49
3.1.2	Generierung einer tembotrionsensitiven <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Mutante	51
3.1.2.1	Wirkung von Tembotrion auf eine putative <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Mutante	52
3.1.3	Tembotrionaufnahme durch <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	53
3.1.3.1	Einfluss von putativen ABC-Transporterinhhibitoren auf die Tembotrionwirkung in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	54
3.1.4	Tembotrionaufnahme und Metabolisierung durch <i>P. patens</i>	58
3.2	Charakterisierung des gewählten Screening-Organismus <i>P. patens</i>	59
3.2.1	Abhängigkeit der Tembotrionwirkung von der Dichte der Starterkultur	60
3.2.2	Untersuchung der HPPD-Inhibitorwirkung auf verschiedene <i>P. patens</i> Gewebetypen	62
3.2.2.1	Die Wirkung von Diketonitril und Mesotrion auf <i>P. patens</i>	62
3.2.2.2	Die Wirkung von HPPD-Inhibitoren auf Gametophyten im Vergleich zu Protonema.....	64
3.2.2.3	Der Einfluss einer Erholungsphase auf die Tembotrionwirkung in regenerierenden Protoplasten	65
3.2.3	Charakterisierung der endogenen <i>P. patens</i> -Gene <i>PpHpd1</i> und <i>PpHpd2</i>	68



Inhaltsverzeichnis

3.2.3.1	Heterologe Expression von HPPD1 und HPPD2.....	69
3.2.3.2	Die Aktivität von HPPD1 und HPPD2 mit und ohne HPPD-Inhibitoren.....	70
3.3	Der Funktionsbeweis: Expression von HPPD-Proteinen in <i>P. patens</i> und die Auswirkung auf die HPPD-Inhibitortoleranz	72
3.3.1	Herstellung transgener Moospflanzen.....	72
3.3.1.1	Generierung der <i>Hpd</i> -Transformationsvektoren	73
3.3.1.2	Transformation von <i>P. patens</i> zur Integration und Expression von <i>Hpd</i> -Genen.....	75
3.3.1.2.1	Molekulare Verifikation der Genintegration in ausgewählten transgenen <i>Hpd</i> -Linien	77
3.3.1.2.2	Nachweis der HPPD-Expression in ausgewählten transgenen Mooslinien	78
3.3.1.3	Die Wirkung von HPPD-Inhibitoren auf transgene <i>Hpd</i> -Mooslinien.....	80
3.3.1.3.1	Toleranzsteigerung in ausgewählten <i>Hpd</i> -transgenen Linien gegenüber Tembotrion.....	80
3.3.1.3.2	Toleranzsteigerung in ausgewählten <i>Hpd</i> -transgenen Linien gegenüber Diketonitril und Mesotrion	84
3.4	Simulierung eines Screens: Multiple Integration mehrerer <i>Hpd</i> -Gene.....	87
3.4.1	Charakterisierung von <i>Hpd</i> -transgenen Linien aus Co-Transformation.....	88
4	Diskussion.....	93
4.1	Die Wahl eines geeigneten Organismus für das neue Screening-System.....	93
4.1.1	Die Eignung von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> als Screening-Organismus	95
4.1.1.1	Optimierungsansätze zur Nutzung von <i>C. reinhardtii</i> als Screening-Organismus	97
4.1.2	<i>Physcomitrella patens</i> : ein vielversprechender Screening-Kandidat.....	100
4.2	Der Funktionsbeweis für das Screening-System mit <i>P. patens</i>	103
4.2.1	Die Integration von <i>Hpd</i> -Genen in <i>P. patens</i>	103
4.2.1.1	Tembotrion als Selektionsmittel	106
4.2.2	Die Expression von HPPD-Proteinen in <i>P. patens</i> erhöht die Toleranz gegenüber HPPD-Inhibitoren	107
4.3	Simulierung eines Screens zur Identifizierung und Evaluierung HPPD-Inhibitor toleranter HPPD-Proteine.....	109
4.4	Zeitlicher Ablauf eines Screens zur Identifizierung neuer HPPD-Inhibitor toleranter HPPD-Proteine.....	112
4.5	Fazit und Ausblick	114
5	Literaturverzeichnis.....	117
6	Anhang	133
6.1	Besondere verwendete Geräte.....	133
6.2	Besondere Verbrauchsmaterialien	133



Inhaltsverzeichnis

6.3	Verwendete Kits	133
6.4	Verwendete Oligonukleotide	134
6.5	Molekulare Verifikation der <i>Hpd</i> -Integration in ausgewählten transgenen <i>Hpd</i> - transgenen Linien	135
6.6	ED ₅₀ -Bestimmung von multiplen <i>Hpd</i> -transgenen Linien aus Co-Transformation .	138
	Eidesstattliche Versicherung	141
	Danksagung	143
	Lebenslauf	145