



Judith Köhler (Autor)

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

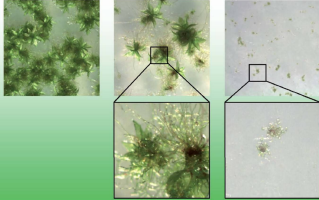
UNIVERSITÄT HOHENHEIM
SCHRIFTENREIHE ZUR PHYSIOLOGIE UND
BIOTECHNOLOGIE DER PFLANZEN



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-Transporterinhilatoren 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 |