

ZMG Kurs für Bioinformatiker

# Entwicklungsgenetik – Protokolle

Stephan Körner, Thomas Holder (Gruppe 13)

06.–13. November 2005

Kursbetreuung: Prof. Dr. G. Jürgens  
Brenser: Esther Dohmann, Katja Schwager



Erstellt mit L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 2<sub>ε</sub>

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Phänotypische Analyse von homöotischen Blütenmutanten</b>	<b>3</b>
1.1	Einleitung . . . . .	3
1.2	Durchführung . . . . .	3
1.3	Ergebnis . . . . .	3
1.4	Diskussion . . . . .	5
1.5	Das ABC-Modell: Von der Genaktivität zum Gen . . . . .	5
<b>2</b>	<b>Herstellung und Analyse von Chromosomen-Präparaten</b>	<b>6</b>
2.1	Einleitung . . . . .	6
2.2	Durchführung . . . . .	6
2.3	Ergebnis & Diskussion . . . . .	6
2.4	Erläuterungen . . . . .	7

# 1 Phänotypische Analyse von homöotischen Blütenmutanten

## 1.1 Einleitung

Entwicklungsgene steuern die Entwicklung. Ihre Produkte, die zeitlich und räumlich exprimiert werden, dienen als Transkriptionsfaktoren für die Expression anderer Gene oder als Elemente von Signalübertragungswegen für die Zell-Zell-Kommunikation. In der Entwicklungsgenetik wird versucht, anhand von Mutanten mit möglichst spezifischen Störungen Rückschlüsse auf die an der Regulation beteiligten Proteine und Gene zu schließen.

Anhand von mutanten Blüten-Phänotypen von *Arabidopsis thaliana* soll in diesem Versuch ein genetisches Modell der Regulation der Blütenorganisation abgeleitet werden. Diese Vorgehensweise wird auch als „Vorwärtsgenetik“ bezeichnet.

## 1.2 Durchführung

Folgende Mutanten standen zur Verfügung:

- Einzelmutanten: *apetala 2 (ap2)*, *pistillata (pi)*, *agamous (ag)*
- Doppelmutanten: *ag pi*, *pi ap2*, *ap2 ag*

Es gibt auch Tripelmutanten (*ap2 pi ag*), jedoch standen diese nicht zur Verfügung. Untersucht wurden die Blüten unter dem Binokular, die Beobachtungen wurden mit Skizzen dokumentiert.

## 1.3 Ergebnis

Einen Teil unserer Beobachtungen zeigen die Abbildung 1(a) bis 2(b), fotografiert durch das Binokular. Die gemeinsamen Auswertungen des ganzen Kurses sind in Tabelle 1 bis 8 zu finden.

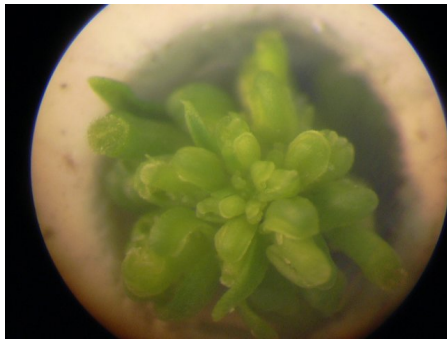


(a) *agamous*

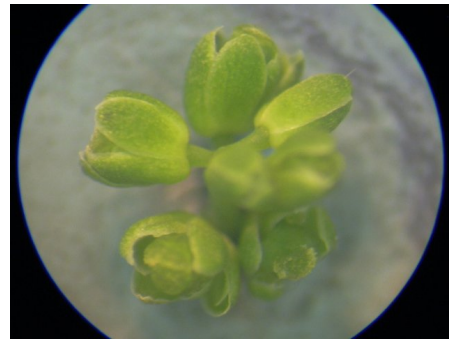


(b) *apetala2*

Abbildung 1: Aufnahmen durch das Binokular



(a) ag-ap2



(b) ag-pi

Abbildung 2: Aufnahmen durch das Binokular

**Legende:** S = Sepetalen, P = Petalen, A = Stamina, C = Carpel, L = Laubblatt

Tabelle 1: Blütendiagramm *Wildtyp*

Wirtel	1	2	3	4
Blattart	S	P	A	C

Tabelle 2: Blütendiagramm *pi*

Wirtel	1	2	3	4
Blattart	S	S	C	C

Tabelle 3: Blütendiagramm *ag*

Wirtel	1	2	3	4
Blattart	S	P	P	[P] <sub>n</sub>

Tabelle 4: Blütendiagramm *ap2*

Wirtel	1	2	3	4
Blattart	C	A	A	C

Tabelle 5: Blütendiagramm *ag pi*

Wirtel	1	2	3	4
Blattart	S	S	S	[S] <sub>n</sub>

Tabelle 6: Blütendiagramm *ap2 ag*

Wirtel	1	2	3	4
Blattart	L	L	L	[L] <sub>n</sub>

Tabelle 7: Blütendiagramm *ap2 pi*

Wirtel	1	2	3	4
Blattart	C	C	C	C

Tabelle 8: Blütendiagramm *ap2 pi ag*

Wirtel	1	2	3	4
Blattart	L	L	L	[L] <sub>n</sub>

## 1.4 Diskussion

Wir stellen fest, dass die Pflanze im Bereich der Blüte offenbar aus einer Reihe homologer Organe aufgebaut ist, welche durch unterschiedliche genetische Regulation ihre unterschiedlichen Phänotypen erhalten. Werden diese Regulationsgene verändert, so entwickelt die Blüte Organe an Stellen, wo diese eigentlich nicht hingehören. In unserem Versuch hatten wir es mit fünf verschiedenen Erscheinungsformen einer Gruppe homologer Organe zu tun. Wenn wir von einer diskreten Aktivierung bzw. Deaktivierung einzelner Regulationsgene ausgehen, so benötigen wir mindestens  $\lceil \log_2 5 \rceil = 3$  Gene. Tatsächlich haben Forschungsgruppen, z.B. die von E. M. MEYEROWITZ (California) oder die von H. SAEDLER (MPI Köln), genau einen solchen Zusammenhang feststellen können. Zur Bildung der Sepalen und Petalen wird eine Genaktivität benötigt, die A genannt wurde, zur Ausbildung von Petalen und Stamen wird eine Genaktivität B benötigt, und zur Ausbildung von Stamen und Karpellen eine Genaktivität C; das heißt, dass zur Ausbildung von Petalen und Stamen zwei Gene benötigt werden, und dass der Wechsel von einem Blütenkreis zum nächsten auf dem sukzessiven Einschalten der entsprechenden Schalter beruht. Abbildung 3 zeigt schematisch die Funktionsweise dieses **ABC-Modells**. Das Schema macht deutlich, dass bei einem Gendefekt nie ein einzelner Wirtel, sondern mindestens zwei benachbarte in ihrer Entwicklung betroffen sind.

## 1.5 Das ABC-Modell: Von der Genaktivität zum Gen

Die vom ABC-Modell beschriebenen Genaktivitäten stimmen nicht alle mit den tatsächlich beteiligten Genen überein. Die Gene sind analog zu ihren Einzelmutanten benannt.

Das Gen AP1 entspricht Genaktivität A. Zu Genaktivität B gehören zwei Gene, es gibt somit zwei verschiedene Einzelmutanten mit dem selben Phänotyp. Die Gene heißen wie die Mutanten AP3 und PI. Zu Genaktivität C gehört wiederum nur ein Gen, das Gen AG. Neben der Differenzierung von Stamen und Karpellen wirkt es außerdem negativ regulierend auf Gen AP1, genau gesagt ist es für die Terminierung der Wirtelbildung zuständig. Ist es deaktiviert, beginnt die Pflanze nach der Bildung des innersten Wirtels wegen der anhaltenden Aktivität von AP1 eine neue Blüte zu bilden. Diese Mutation ist ein oft gewollter Effekt im Blumenhandel, weil somit viel vollere Blüten gezüchtet werden können.

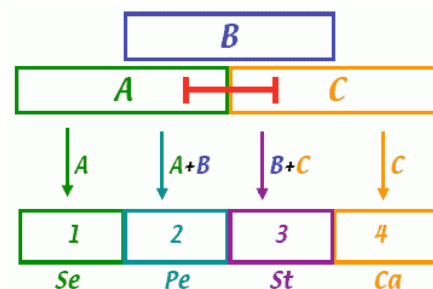


Abbildung 3: ABC-Modell zur Veranschaulichung der Regulation der Organidentität.

## 2 Herstellung und Analyse von Chromosomen-Präparaten

### 2.1 Einleitung

Chromosomen sind lineare, mit Proteinen komplexierte DNA-Makromoleküle. Der Strang endet zu beiden Seiten mit einer definierten Sequenz, den Telomeren. Diese dienen unter anderem dazu, dem Reparatursystem der Zelle die Detektion von Chromosomenbrüchen zu ermöglichen. Da das Reparatursystem jedoch lediglich in der Lage ist, zwei freie Enden — die nicht notwendigerweise zusammen gehören — zu verbinden, kann es zur Bildung von abnormalen Strukturen führen.

In den Speicheldrüsen der *Drosophila* Larven sind polytäre Chromosome vorhanden. Da in diesen Speicheldrüsen bis zu 10 Endozyklen nacheinander ablaufen können, sind bis zu 1000 Kopien von jedem Chromosom parallel zueinander angeordnet. Dies hat zur Folge, dass diese Chromosome 100 mal größer sind als normale Chromosomen und somit auch unter dem Lichtmikroskop sichtbar. Somit ist es auch möglich im Vergleich von Wildtyp- und Mutanten-DNA fehlerhaft reparierte Abschnitte wie Deletionen, Insertionen, Reversionen oder Translokationen zu identifizieren.

### 2.2 Durchführung

Ziel dieses Versuches war es Riesenchromosome aus Speicheldrüsen zu präparieren und auf Mutationen zu untersuchen. Zuerst zerrissen wir die Larve in zwei Teile. Der interessante Teil war der Kopf mit den Speicheldrüsen. Zuvor wurde die ganze Larve in Essigsäure getötet. Danach wurde der Kopf mitsamt den Speicheldrüsen mit Orcein eingefärbt. Nach der Einfärbung wurde das Präparat in eine Waschlösung gegeben. In dieser Lösung wurde der Kopf zertrümmert und schließlich ein Deckglas auf das Präparat gelegt. Dann wurden das Präparat gequetscht um die Chromosomen vom Zellkern zu lösen und zu einem gleichmäßigen aufplatzen der Kerne zu führen. Anschließend wurde das gesamte Präparat mit Nagellack versiegelt, um es vor Austrocknung zu schützen.

### 2.3 Ergebnis & Diskussion

Da wir bei diesem Versuch leider nicht wirklich das Ergebnis, welches wir wollten, erzielen konnten, können wir uns in diesem Abschnitt lediglich auf die Diskussion dessen konzentrieren, was wir eigentlich erwartet hätten.

Warum wir kein Riesenchromosom präparieren konnten lag unserer Meinung vermutlich daran, dass zum einen solch eine Präparation viel Geschick benötigt, zum anderen aber auch etwas Glück und vor allem viel Übung. Da bei uns anscheinend vor allem die Übung aber auch das Glück fehlte, konnten wir leider keine Riesenchromosome — geschweige denn spezielle Mutationen — durch unser Mikroskop sehen. Tatsächlich gelang es genau einer Gruppe des gesamten Kurses ein Präparat zu erstellen, bei welchem man die Bandenmuster der Riesenchromosomen erahnen konnte.

Somit diskutieren wir hier also nur Dinge, die wir unter Umständen gesehen hätten. Zum einen hätten wir bei einer Mutante Chromosomen erkennen können, bei denen entweder der Strang verkürzt ist, oder die kurze Ausstülpungen haben. Das sind dann

Deletionen (im zweiten Fall nur auf einer Seite des Doppelstrangs), die durch Brüche und falsche Reparatur entstehen. Zum anderen sind bei genauem Hinsehen als weitere Mutationen Inversionen zu sehen. Das heißt das Bandenmuster verläuft in umgekehrter Orientierung. Eine Inversion entsteht nach zwei versetzten Brüchen im selben Chromosom. Als dritte und letzte Mutation wäre noch eine Translokation zu sehen gewesen. Bei dieser wären Banden von einem Bereich in einen anderen versetzt gewesen. Diese Mutation entsteht ebenfalls auf Grund zweier Chromosomenbrüche auf nicht homologen Chromosomen, wobei die Fragmente über Kreuz fusionieren. Vor allem die Deletion wirkt sich meist letal aus. Alle anderen Mutationen führen nicht zum unmittelbaren Exitus, können aber dennoch für einen verfrühten Tod verantwortlich sein. Entscheiden ist immer welches Gen betroffen ist und wie lebensnotwendig dieses ist.

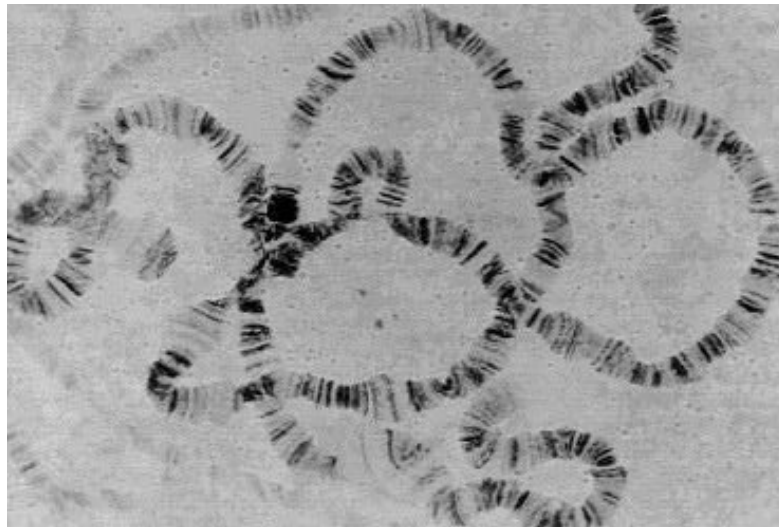


Abbildung 4: Leider kein Foto von uns, aber in etwa sowas hätten wir als Versuchsergebnis auf unserem Objektträger erwartet. Schön zu erkennen ist auf dieser Aufnahme das Bandenmuster, mit dessen Identität werden die verschiedenen Mutationserscheinungen identifiziert.

## 2.4 Erläuterungen

In diesem Kapitel erläutern wir wie prinzipiell Transpositionen, Deletionen, Inversionen, und Duplikationen. Was alle Mutationen gemeinsam haben, ist dass bevor solch eine Mutation zustande kommt in den Chromosomen mindestens zwei oder mehr Brüche entstanden sind. Die darauf folgende Reparatur des Chromosoms ist entscheidend für die Art der Mutation. Natürlich nur die nicht korrekte Reparatur, denn eine korrekte Reparatur würde ja den Ursprungszustand wiederherstellen und keine Mutation erzeugen. Im Allgemeinen versuchen die Reparaturmechanismen einen Zustand zu erreichen, in dem das Chromosom wieder beide Telomere und ein Centromer hat. Bei einer **Deletion** sind zwei Brüche nötig. Der Bereich zwischen den Brüchen geht bei einer Deletion

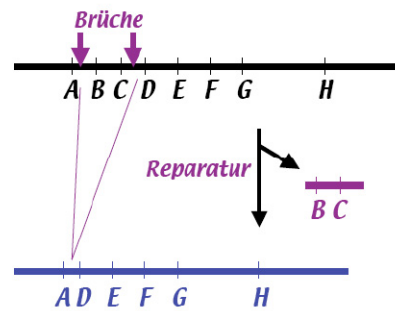


Abbildung 5: Entstehung einer Deletion

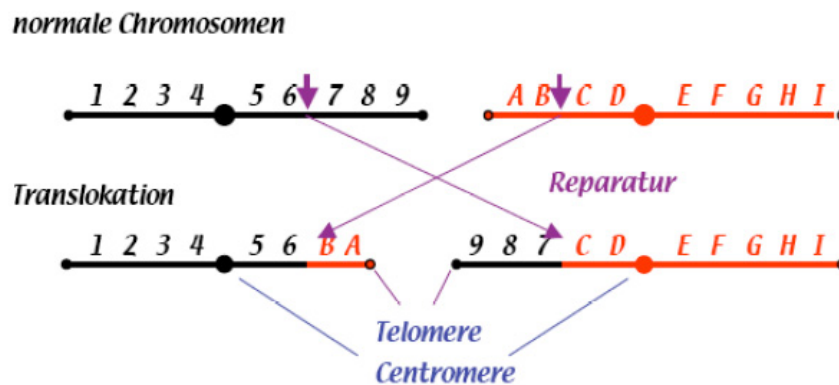


Abbildung 6: Entstehung einer Translokation

einfach verloren (siehe Abb.5). Bei einer **Transposition** geht der Bereich nicht verloren sondern wird fälschlicherweise an einer anderen Stelle wieder eingebaut. Hier sind also drei Brüche notwendig. Bei der **Inversion** wird ein Teil des Chromosoms, der zuerst durch 2 Brüche entstanden ist wieder falschherum eingesetzt. Man unterscheidet dabei, ob das Centromer eingeschlossen ist oder nicht. Wenn das Centromer mit invertiert wird, handelt es sich um eine perizentrische Inversion, ansonsten um eine parazentrische (siehe Abb.8). Bei der **Duplikation** sind zwei versetzte Brüche notwendig und eine Reparatur über Kreuz. Das Resultat ist eine Deletion in dem einem Strang und eine Duplikation im anderen (siehe Abb.7). Eine **Translokation** entsteht, durch zwei Brüche in unterschiedlichen Chromosomen und einer Reparatur über Kreuz (siehe Abb.6).



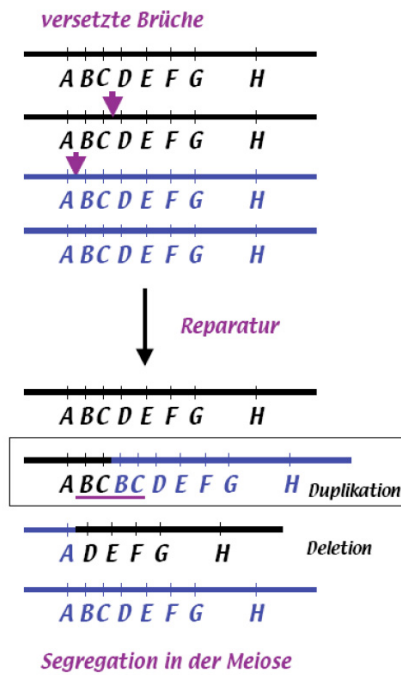


Abbildung 7: Entstehung einer Duplikation

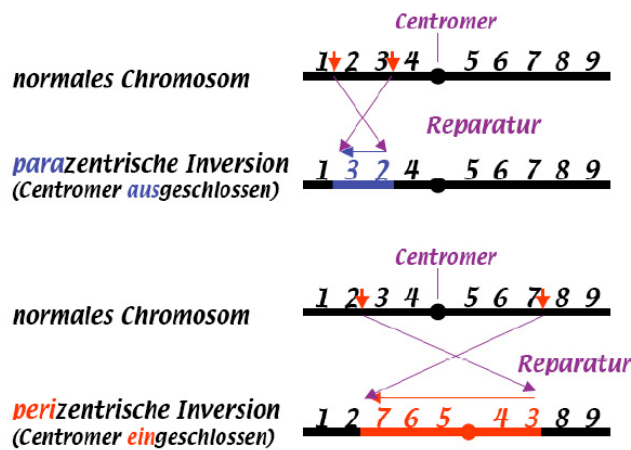


Abbildung 8: Entstehung einer Inversion