

**Transformation der Plastiden und Mitochondrien  
bei höheren Pflanzen -  
Selektive Marker und Einsatzmöglichkeiten**

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von

**Holger Loos**

eingereicht am 5.3.2004

Tag der mündlichen Prüfung, 2.4.2004

1. Gutachter: **Dr. habil. W. Kofer**
2. Gutachter: **Prof. Dr. P. Dittrich**

## für Linus

Er betrachtete die Blätter der kleinen Pflanze,  
wie sie um den Stängel her so hübsch.  
so merkwürdig klug geordnet waren.  
Schön waren die Verse des Vergil, er liebte sie;  
aber es stand mancher Vers im Vergil,  
der nicht halb so klar und klug,  
nicht halb so schön und sinnvoll war  
wie die spiralige Ordnung dieser winzigen Blättchen am  
am Stengel empor.

Welch ein Genuß, Welch ein Glück,  
welch ein entzückendes, edles und sinnvolles Tun wäre es,  
wenn ein Mensch es vermöchte,  
eine einzige solche Blume zu erschaffen!  
Aber keiner vermochte das,  
kein Held und kein Kaiser,  
kein Papst und kein Heiliger

(aus HERMANN HESSE: Narziß und Goldmund)

# Inhaltsverzeichnis

## Einleitung

1.1	Endosymbiose als Motor der Evolution	1
1.2	Mitochondriale Genomorganisation	4
1.2.1	Die mitochondriale Atmungskette	6
1.2.2	Mechanismen von Atmungsketteninhibitoren	7
1.2.3	Mitochondrientransformation	10
1.3	Plastidäre Genomorganisation	11
1.3.1	Plastidentransformation	13
1.4	Ziele und Ablauf der Arbeit	19
1.4.1	Mitochondrientransformation	20
1.4.1.1	Mitochondrienspezifischer Transformationsansatz	23
1.4.1.2	Generelle Hemmstoffe zur Mitochondrientransformation	25
1.4.2	Plastidentransformation	

## Material und Methoden

2.1	Biochemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial	30
2.2	Pflanzenmaterial	35
2.3	Bakterien und Vektoren	35
2.4	Methoden zur Herstellung rekombinanter DNA-Klone	37
2.4.1	Allgemeine Methoden	37
2.4.2	Isolierung von Plasmid-DNA	37
2.4.3	Agarose-Gelelektrophorese	38
2.4.4	Ligation	38
2.4.5	Transformation von <i>E.coli</i> -Bakterien	39
2.4.6	Klonierung von PCR-Fragmenten	39
2.4.7	Herstellung von Transformationsvektoren durch Inverse PCR	40
2.4.8	Aufbau der mitochondrialen Transformationskassetten mit einem resistenzverleihenden Markergen	44
2.9.4	Modifikation des mitochondrialen Transformationsvektors pBM <i>hph</i> II	45
2.4.10	Herstellung der plastidären Transformationsvektoren	46
2.5	Methoden zur Analyse von DNA	48
2.5.1	Allgemeine Methoden	48

2.5.2	Isolierung von DNA aus Tabakpflanzen	48
2.5.3	Southern-Analyse und verwendete DNA-Sonden	49
2.5.4	PCR	50
2.5.5	Mini-PCR	51
2.5.6	DNA-Sequenzierung	52
2.6	Methoden zur Analyse von RNA	52
2.6.1	Isolierung von RNA aus Tabakpflanzen	52
2.6.2	RNA-Agaroseelektrophorese und Northern-Hybridisierung	53
2.7	Nachweis des GUS-Proteins	54
2.7.1	Histologischer GUS-Nachweis	54
2.8	Bestimmung des Lysingehaltes	54
2.8.1	Homogenisierung des Pflanzenmaterials	54
2.8.2	PITC-Derivatisierung	55
2.8.3	Aminosäuregehaltsanalyse mittels HPLC	55
2.9	Stabile Transformation des Plastiden- und Mitochondriengenoms	57
2.9.1	„ <i>In-vitro</i> “ Kultur von Tabakpflanzen	57
2.9.2	Suspensionskultur von Tabak, <i>rpo</i> -Tabak und Arabidopsis	59
2.9.3	„ <i>In-vitro</i> “ Kultur von Kartoffelpflanzen	60
2.9.4	Stabile PEG-Transformation von Tabakprotoplasten	62
2.9.4.1	Protoplastierung von Tabakblättern	62
2.9.4.2	Protoplastierung von <i>rpo</i> -Tabakblättern	63
2.9.4.3	Protoplastierung von Tabak und <i>rpo</i> -Tabak Suspensionskulturen	64
2.9.4.4	PEG-Transformation und Protoplastenregeneration bei Tabak und <i>rpo</i> -Tabak	64
2.9.5	Stabile PEG-Transformation von Kartoffelprotoplasten	66
2.9.5.1	Protoplastierung von Kartoffelblättern	66
2.9.5.2	PEG-Transformation und Protoplastenregeneration bei der Kartoffel	67
2.9.6	Particle gun-Transformation von pflanzlichen Organellen	67
2.9.6.1	Beschichten der Goldpartikel mit DNA	67
2.9.6.2	Beschuss des pflanzlichen Gewebes mit den DNA- beladenen Gold-partikeln	68
2.10	Bestimmung der Selektionsbedingungen	69

## Ergebnisse

3.1	Stabile Transformation pflanzlicher Mitochondrien	72
3.1.1	Bestimmung der Selektionsbedingungen	72
3.1.1.1	Selektionsbedingungen bei Blattstücken	72
3.1.1.1.1	Testreihen mit den Hemmstoff Blasticidin bei Blattstücken	73
3.1.1.1.2	Testreihen mit den Hemmstoff Chloramphenicol bei Blattstücken	73
3.1.1.1.3	Testreihen mit den Hemmstoff Hygromycin bei Blattstücken	75
3.1.1.1.4	Testreihen mit den Hemmstoff Antimycin bei Blattstücken	75
3.1.1.1.5	Testreihen mit den Hemmstoff Myxothiazol bei Blattstücken	77
3.1.1.1.6	Testreihen mit den Hemmstoff Moa-Stilben bei Blattstücken	78
3.1.1.2	Selektionsbedingungen bei Blattstücken/Mikrokolonien	81
3.1.1.2.1	Mikrokolonietestreihen mit dem Hemmstoff Blasticidin	81
3.1.1.2.2	Mikrokolonietestreihen mit dem Hemmstoff Chloramphenicol	81
3.1.1.2.3	Mikrokolonietestreihen mit dem Hemmstoff Hygromycin	82
3.1.1.2.4	Mikrokolonietestreihen mit dem Hemmstoff Antimycin	82
3.1.1.2.5	Mikrokolonietestreihen mit dem Hemmstoff Myxothiazol	82
3.1.1.2.6	Mikrokolonietestreihen mit dem Hemmstoff Moa-Stilben	84
3.1.1.2.7	Mikrokolonietestreihen mit dem Hemmstoff n-Propyl-Gallat	84
3.1.1.3	Selektionsbedingungen bei Suspensionskulturen	85
3.1.2	Analyse der potentiellen Mitochondrientransformanten	92
3.1.2.1	Analyse Chloramphenicol-resistenter Linien	92
3.1.2.2	Analyse Antimycin- und Myxothiazol-resistenter Linien	92
3.1.2.3	Analyse Hygromycin-resistenter Linien	94
3.1.2.3.1	Analyse der pBMhph II-Transformanten	95
3.1.2.3.1	Analyse der pBMhph III- und pBMhph IV-Transformanten	103
3.1.2.4	Analyse Moa-Stilben-resistenter Linien	105

3.2	Stabile Transformation von Plastiden	110
3.2.1	Bestimmung der Selektionsbedingungen	110
3.2.1.1	Selektionsbedingungen bei Tabak	111
3.2.1.1.1	Selektionsbedingungen bei Blattstücken	111
3.2.1.1.2	Selektionsbedingungen bei Protoplasten/ Mikrokolonien	113
3.2.1.2	Selektionsbedingungen bei Kartoffel	114
3.2.2	Analyse der plastidären Transformanten	115
3.2.2.1	Analyse der mit Spectinomycin selektierten Linien	117
3.2.2.2	Analyse der mit AEC selektierten Linien	121
<b>Diskussion</b>		
4.1	Mitochondrientransformation	127
4.1.2	Transformationsmethode	128
4.1.3	Auswahl des Zielgewebes	129
4.1.4	Aufbau der Transformationsvektoren	131
4.1.4.1	Homologe Rekombination	131
4.1.4.2	Transformationsvektoren der Markergen-Strategie	133
4.1.4.2.1	Mitochondrialer Integrationsort	133
4.1.4.2.2	Mitochondriale Regelelemente	138
4.1.4.2.3	Resistenzgene	139
4.1.4.3	Mitochondrienspezifische Transformationsvektoren	142
4.1.5	Bestimmung der Selektionsbedingungen	148
4.2	Plastidentransformation	149
4.2.1	Aufbau der Transformationsvektoren	150
4.2.2	Veränderung des Lysingehaltes durch Plastidentransformation	151
4.2.3	AEC, ein universeller antibiotikafreier plastidärer Selektionsmarker	159
<b>Zusammenfassung</b>		164
<b>Literatur</b>		167
<b>Anhang</b>		
	Lysingehaltsbestimmung in Tabaktransformanten	196
	Abbildungsverzeichnis	197
	Tabellenverzeichnis	199
	Lebenslauf	200
	Danksagung	201

## Abkürzungen

A	Adenin
AEC	S-Aminoethyl-L-Cystein
Anti	Antimycin A
amp	Ampicillin
AOX	alternative Oxidase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriophosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
<i>cob</i>	Cytochrome <i>b</i>
cpDNA	plastidäre DNA
$\Delta p$	Membranpotential
DHDPS	Dihydrodipicolinatsynthase
DNA	Desoxyribonukeinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphate
E	Glutaminsäure
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Phenylalanin (AS)
G	Guanin
G	Glycin (AS)
g	Gramm und Erdbeschleunigung ( $9,81\text{ms}^{-2}$ )
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	Bidestilliertes Wasser
I	Isoleucin (AS)
IAA	$\beta$ -Indolylessigsäure
IR	„inverted repeat“ oder Invertierte Sequenzwiederholung
kB	Kilobasen
L	Leucin (AS)
M	molar
M	Methionin
MES	(2-(N-Morpholino-)ethansulfonsäure
min	Minute
mM	millimolar
Moa	$\beta$ -(E)-Methoxyacrylat
MOPS	2-Morpholinoethansulfonsäure
mtDNA	mitochondriale DNA
Myx	Myxothiazol
$\mu$	Mikro-
N	Purin- und Pyrimidinreste
NAA	$\alpha$ -Naphthylelessigsäure
NAD(P)H/H <sup>+</sup>	Nicotinamidadeninukleotid(phosphat) (reduzierte Form)
nt	Nukleotid(e)
nPG	n-Propyl-Gallat
OD	optische Dichte
Oligos	Oligodesoxyribonukleotide
ORI	Orientierung (von Genkassetten)
<i>orf</i>	„open reading frame“, offener Leserahmen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PITC	Phenylisothiocyanat
PP	Protoplasten
PS	Polystyrol
rDNA	ribosomale DNA
R	Arginin

RBS	„ribosome binding site“, Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm (upm)	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RUBISCO	Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase
s	Sekunde
S	Serin (AS)
ssDNA	einzelsträngige DNA
SSC	„small single copy region“ oder Kleine Einzelkopieregion
T	Threonin
T	Thymin
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur der DNA (M=„melting“)
Tris	Trishydroxyaminomethan
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
u	Unit, Einheit der Enzymaktivität
V	Valin (AS)
Vol	Volumen
v/v	volume/volume
WT	Wildtyp
w/v	weight/volume
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-galactopyranosid

# 1 Einleitung

## 1.1 Endosymbiose als Motor der Evolution

Schon 1905 formulierte Mereschkowsky in Ansätzen die Endosymbiontenhypothese, welche besagt, dass Mitochondrien und Plastiden ihren Ursprung in Bakterien-ähnlichen Organismen haben, die von einer einen Nukleus enthaltenden Zelle aufgenommen wurden und mit dieser in eine symbiotische Verbindung traten (Margulis, 1970, 1981). Diese lange umstrittene Hypothese gilt heute allgemein als bewiesen. Durch phylogenetische Analysen kleiner mitochondrialer ribosomaler RNA-Sequenzen und ihrer eubakteriellen Homologen wird deutlich, dass der Vorfahr der Mitochondrien sich im Feld der  $\alpha$ -Proteobakterien befindet (Yang et al., 1985). Die Chloroplasten entstammen dagegen einer Endosymbiose mit einem Cyanobakterium (Melkonian et al. 1995).

Auf der Suche nach dem Ursprung der Eukaryoten waren amitochondriale Protisten (Archaezoa) vielversprechende Kandidaten der eukaryotischen Wirtszelle für die mitochondriale Endosymbiose (Cavalier-Smith, 1987). Bei einer Gruppe von Protisten findet man anstelle der Mitochondrien Hydrogenosomen (Müller, 1993). Durch phylogenetische Untersuchungen ist ein gemeinsamer Ursprung beider Organellen belegt (Bui et al., 1996). In den Hydrogenosomen des Ciliaten *Nyctotherus ovalis* wurde sogar ein funktionelles Genom entdeckt (Akhmanova, et al., 1998). Bei einer Reihe amitochondrialer Protisten, die weder Mitochondrien noch Hydrogenosomen besitzen (Microsporidia/Parabasalia/Trichomona), konnte ein sekundärer Verlust der Mitochondrien belegt werden (Clark und Roger, 1995; Germot et al., 1997; Hirt et al., 1997; Roger et al., 1998; Hashimoto et al., 1998). Aufgrund dieser Ergebnisse ist es fraglich, ob sich überhaupt rezente „missing links“ in Form amitochondrialer Protisten finden lassen (Vogel, 1997). Nach der „Wasserstoff Hypothese“ (Martin-Müller-Hypothese) hat es einen solchen Organismus nie gegeben (Martin und Müller, 1998). Sie steht im Einklang mit der aus Sequenzanalysen abgeleiteten Erkenntnis, dass die Gene der Eukaryoten dualen Ursprungs sind und ihre Wurzeln bei den Bakterien (Eubakterien) und den Archaea (Archaeobakterien) haben, bei Organismen aus zwei völlig verschiedenen Reichen, denen lediglich ihre prokaryotische Natur gemeinsam ist. Demnach entstanden Eukaryoten mit Promitochondrien direkt durch die endosymbiotische Aufnahme eines  $\alpha$ -Proteobakteriums durch ein Archaeobakterium. Die nächsten noch lebenden Verwandten der Mitochondrien sind vermutlich intrazelluläre Parasiten der Gattungen *Rickettsia*, *Anaplasma* und *Ehrlichia* (Gray und Spencer, 1996). Durch Vergleiche zwischen dem Bakterien-ähnlichsten mitochondrialen Genom aus *Reclinomonas americana* (Lang et al., 1997) und

dem Mitochondrien-ähnlichsten eubakteriellen Genom aus *Rickettsia prowazekii* konnten einige Genanordnungen (z.B. *rplKAJL* und *rpoBC*) identifiziert werden, die in beiden Genomen identisch sind und vermutlich noch aus dem gemeinsamen Vorfahren stammen (Andersson et al., 1998). Phylogenetische Analysen von 16S rRNA (Gray und Spencer, 1996), des Cytochrom *b*-Gens (Sicheritz-Pontén et al., 1998) und der Gene *cox* I-III unterstützen zudem einen monophyletischen Ursprung aller Mitochondrien (Viale und Arakaki, 1994; Gray et al., 1999).

Im Gegensatz zum Ursprung der Eukaryoten und Mitochondrien ist der Erwerb der Chloroplasten schon recht genau aufgeklärt. Biochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen legten schon relativ früh eine Verwandtschaft zwischen Plastiden und Cyanobakterien nahe (Stanier, 1970). Vergleichende Analysen von Genorganisation und Genexpression (z.B. Rifampicin hemmt die Transkription in Plastiden und Cyanobakterien [Loiseaux, et al., 1975]) unterstützten ebenfalls einen cyanobakteriellen, endosymbiotischen Ursprung aller Plastiden. Phylogenetische Analysen von einzelnen Genen und rRNA-Sequenzen (Gray, 1988, 1989, 1992, Gray et al., 1999; Loiseaux-de Goer, 1994; Douglas, 1994; Bhattacharya und Medlin, 1995) und schließlich sogar von vollständigen Plastidengenomen (Martin et al., 1998) lassen keinen Zweifel daran, dass Plastiden einen cyanobakteriellen Vorfahren besitzen. Es zeigte sich aber auch, dass die Plastiden unterschiedlicher Algen mehrfach rekrutiert wurden (Delwiche und Palmer, 1997). In Abhängigkeit vom Mechanismus unterscheidet man dabei zwischen primären und sekundären Endosymbiosen. Bei der primären Endosymbiose hat eine eukaryotische Wirtszelle ein Cyanobakterium aufgenommen und zum Plastiden reduziert, dieser ist von zwei Membranen umgeben (Sitte, 1993). Aus Untersuchungen der Membranzusammensetzung schließt man, dass die äußere Membran von der Nahrungsvakuole der Wirtszelle und die innere Membran von einer Membran des Cyanobakteriums abstammt (Melkonian et al., 1995). Neben den Landpflanzen besitzen auch ihre phylogenetischen Vorläufer, die Grünalgen sowie die Rotalgen und die Glaukophyta einen einfachen Plastiden (2 Membranen) (van den Hoek et al., 1993; Bhattacharya und Schmidt, 1997). Mittlerweile geht man davon aus, dass diese drei Algenklassen von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen, der bereits einen Plastiden besessen hat (Kowallik, 1994; Bhattacharya und Medlin, 1995; Douglas, 1998). Somit ebnete eine einzige primäre Endosymbiose den Weg zu photoautotrophem Wachstum aller plastidenhaltigen Eukaryoten inklusive der Landpflanzen. Neben den Gruppen mit einfachen Plastiden gibt es eine Reihe von Algen mit komplexen Plastiden, die von 3 oder 4 Membranen umgeben sind. Diese entstammen einer sekundären Endosymbiose (Sitte, 1993). Dabei wurde

ein bereits photosynthetischer Eukaryot von einer eukaryotischen Wirtszelle aufgenommen und zum Plastiden reduziert (McFadden, 1993; Häuber et al., 1994). Molekulare Analysen belegen, dass es mehrere sekundäre Endosymbiosen gab (Maier et al., 1991; Hallick et al., 1993; McFadden et al., 1994). Die Wirtszellen haben in diesen Fällen eine Grün- oder Rotalge aufgenommen, dementsprechend können die komplexen Plastiden der „grünen“ oder „roten Linie“ zugeordnet werden (Delwiche und Palmer, 1997). Eine evolutionäre Besonderheit stellen die Chlorarachniophyta „grüne Linie“ (McFadden et al., 1995; Van de Peer et al., 1996; Ishida et al., 1997) und die Cryptophyta „rote Linie“ (Douglas et al., 1991; Cavalier-Smith et al., 1996) dar. Die Plastiden beider Algengruppen sind von vier Membranen umgeben, sie besitzen jedoch zwischen dem äußeren und inneren Membranpaar ein zusätzliches Genom, das Nukleomorph (McFadden et al., 1997). Dabei handelt es sich um das extrem reduzierte Genom des jeweiligen Endosymbioten, welches „noch“ nicht vollständig integriert wurde. Es konnte somit gezeigt werden, dass neben den Plastiden der Chlorarachniophyta und Cryptophyta auch deren Wirtszellen einen unterschiedlichen evolutionären Ursprung haben (McFadden et al., 1994; Bhattacharya et al., 1995).

In allen bisher untersuchten Organismen führte die Endosymbiose zu einer drastischen Verkleinerung und Verdichtung des ehemals bakteriellen Genoms. Es erfolgte ein meist sehr intensiver Gentransfer, hauptsächlich vom Symbionten (Mitochondrien bzw. Plastiden) zum Wirt, wobei der Wirt die Kontroll- und Regulationsmechanismen übernahm. Dies wird besonders deutlich bei der Analyse des Kerngenoms von *Saccharomyces cerevisiae*. Hier stammen nur ca. 30% des Genmaterials vom Ur-Wirt, der Rest ist im Laufe der Evolution von den Symbionten übertragen worden. Die molekularen Mechanismen des Gentransfers sind noch weitgehend ungeklärt. Einerseits beschreiben Schuster und Brennicke (1987, 1994) ein Modell des Gentransfers über den Transfer von mRNA-Molekülen, gefolgt von reverser Transkription und Integration der entstandenen cDNA, andererseits ist ein direkter DNA-Transfer zwischen den drei Kompartimenten Zellkern, Chloroplasten und Mitochondrien als wahrscheinlich anzusehen. (Hemleben, 1990; Herrmann, 1992; Kemble et al., 1985; Lonsdale, 1985; Timmes und Scott, 1985; Schuster et al., 1988; Fukuchi et al., 1991). Beim Tabak konnten bis zu 18 kBp lange Fragmente plastidärer DNA im Zellkern identifiziert werden (Ayliffe und Timmis, 1992). Diese zum Teil in hoher Kopienzahl vorliegenden Sequenzen, die auch als „promiscuous DNA“ (Ellis, 1982) bezeichnet werden, sind mögliche Anwärter für Intermediate eines vermutlich noch andauernden Transferprozesses. In jedem Fall kann eine funktionelle Übertragung eines essentiellen Organellgens in den Zellkern nur dann erfolgen, wenn es eukaryotische Regelelemente für seine Transkription (Promotor)

sowie eine für den Transport des kodierten Proteins zum Organell nötige Importsequenz erwirbt. Einhergehend mit der Verlagerung plastidärer und mitochondrialer Gene in den Zellkern, ist eine sehr komplexe Regulation der Genexpression entstanden.

## 1.2 Mitochondriale Genomorganisation

Die Reduktion des mitochondrialen Genoms ist im Laufe der Evolution sehr unterschiedlich zwischen Tieren, Pilzen und höheren Pflanzen verlaufen. Das pflanzliche Mitochondrien-Genom unterscheidet sich dabei in wesentlichen Punkten von den übrigen höheren Eukaryoten. Gegenüber den Mitochondriengenomen von Tieren und Pilzen ist das pflanzliche weniger stark vergrößert. Es bestehen jedoch in einigen Fällen deutliche Größenunterschiede zwischen, aber auch innerhalb der Familien. So variiert die mt-Genomgröße in der Familie der *Cucurbitaceae* von 330 kB bei *Citrullus lanatus* (Wassermelone) bis zu 2500 kB bei *Cucumis melo* [(Zuckermelone) Leaver, 1989]. Das kleinste bisher bekannte mt-Genom im Pflanzenreich ist vermutlich bei den *Brassica*-Arten mit Größenordnungen von 208 bis 218 kB zu finden (Newton, 1988). Damit überschreiten sie die Größe der tierischen (15-18 kB) und der meisten pilzlichen (19-176 kB) mt-Genome um ein Vielfaches (Mannschedel, 1989). Neben der unterschiedlichen Größe sind die mitochondrialen Genome unter anderem dadurch gekennzeichnet, dass die Sequenzen der einzelnen Gene zwar hochkonserviert, ihre Anordnung und Anzahl zueinander aber erheblich zwischen den einzelnen Spezies variiert. Ein Grund liegt vermutlich in der hohen Rekombinationsfrequenz der Chondriome, die immer wieder zu neuen Anordnungen der Gene innerhalb der mitochondrialen DNA führt. Man geht davon aus, dass sich das mitochondriale Genom höherer Pflanzen aus heterogenen Populationen verschiedener ringförmiger DNA-Moleküle zusammensetzt. In einfachen Fällen treten ein Hauptring (mastercircle) und ein oder mehrere kleinere Ringe (subcircle) auf. Eine Ausnahme bildet die mt-DNA von *Brassica hirta*, bei der Palmer und Herbon (1987) nur ein einfaches zirkuläres Molekül nachweisen konnten. Die Entstehung solcher subcircle basiert auf Rekombinationsereignissen zwischen sich wiederholenden Sequenzen. Solche Rekombinationsereignisse können zwischen kurzen Sequenzen „short repeats“ (weniger als 200 Bp) und langen Sequenzen „long repeats“ stattfinden. Neben den master- und subcircles sind aber auch extrachromosomale lineare DNA- und RNA Plasmide isoliert worden (Hemleben, 1990; Lonsdale und Grienenberger, 1996; Finnegan und Brown, 1986; Newton, 1988; Grill und Garger, 1981; Backert et al., 1998). Anhand von Sequenzanalysen des mitochondrialen Genoms von *Arabidopsis thaliana* weiß man, dass mitochondriale Leseraster relativ ungleichmäßig über das Chondriom verteilt sind. Die meisten Gene liegen in sogenannten Gen-„clustern“ zusammen. Man findet aber auch isolierte Leseraster, die von

größeren Bereichen nicht-kodierender Sequenzen umgeben sind (Unsold et al., 1997). Die relativ großen Genome der Samenpflanzen beruhen einerseits auf einer im Vergleich zu mitochondrialen Genomen aus Tieren und Pilzen erhöhten Anzahl an Genen, z. B. scheinen bestimmte Gene für die Blütenentwicklung im Chondriom lokalisiert zu sein, und andererseits auf dem Vorkommen von Introns (Kofer et al., 1991). Der überwiegende Teil der DNA repräsentiert jedoch nicht kodierende Sequenzen. Untersuchungen der mt-DNA bei *Cucurbitaceae*, *Brassica campestris*, Zuckerrübe und Weizen (Lonsdale und Grienberger, 1996) zeigen, dass die „zusätzliche“ mt-DNA keine zusätzliche Information besitzt, da ein großer Anteil nicht konserviert ist und vermutlich keine kodierenden Bereiche enthält. Der kleinere konservierte Anteil, auch core-mt-DNA genannt, kodiert eine Reihe von Genen. Beim vollständig sequenzierten mt-Genom von *Arabidopsis thaliana* konnten 57 Gene identifiziert werden, die nur 10% des Genoms in Anspruch nehmen (Unsold et al., 1997). Die bisher identifizierten Gene pflanzlicher Mitochondrien kodieren die ribosomale-RNA (mt-rRNA) *rrn26*, *rrn18* und *rrn5*, einige der erforderlichen tRNA's, sowie ca. 25-30 Polypeptide. Damit reicht die Anzahl der mitochondrialen Gene und Polypeptide, die zum Aufbau der Funktionskomplexe in der inneren Mitochondrienmembran sowie von Ribosom-Untereinheiten benötigt werden, nicht mehr aus. Bisher sind bis zu 16 tRNA-Gene in Mitochondrien-Genomen identifiziert worden, wobei die Anzahl zwischen verschiedenen Spezies stark variieren kann. Bei der Kartoffel wurden beispielsweise 15 mt-tRNA-Gene ermittelt. Um eine vollständige Translation zu ermöglichen, benötigen die Mitochondrien aber mindestens 23 tRNA-Gene. Die fehlenden tRNA-Gene müssen aus dem Cytosol importiert werden. Es konnten bei der Kartoffel 12 mt-tRNA's identifiziert werden, die Produkte nukleärer Gene sind (Richter, 1996). Man vermutet, dass ein Teil der mt-tRNA's sogenannte Pseudogene sind, die nicht transkribiert werden. Sie stellen ein Bindeglied der evolutionären Verlagerung der Organellgene in den Kern dar.

Ein weiteres Beispiel für die Verlagerung von genetischer Information aus den Mitochondrien in den Zellkern findet sich in der Familie der *Leguminosae*. Verschiedene Evolutionsstufen repräsentieren dabei das Ausmaß der Verlagerung von mt-Genen in den Kern. An Hand des mitochondrialen *coxII*-Gens lässt sich dies besonders gut darstellen (Nugent und Palmer, 1991; Covello und Gray, 1992; Schuster und Brennicke, 1994). Während bei der Erbse das *coxII*-Gen zwar in den Zellkern übertragen wurde, findet die Expressierung ausschließlich in den Mitochondrien statt. Bei der Sojabohne ist ebenfalls eine Kopie des Gens im Zellkern vorhanden, die jedoch im Gegensatz zur Erbse die volle Funktion übernimmt, obwohl das Gen nach wie vor im mt-Genom vorliegt. Bei der Mung-Bohne und bei ‚Cow pea‘ fehlt das

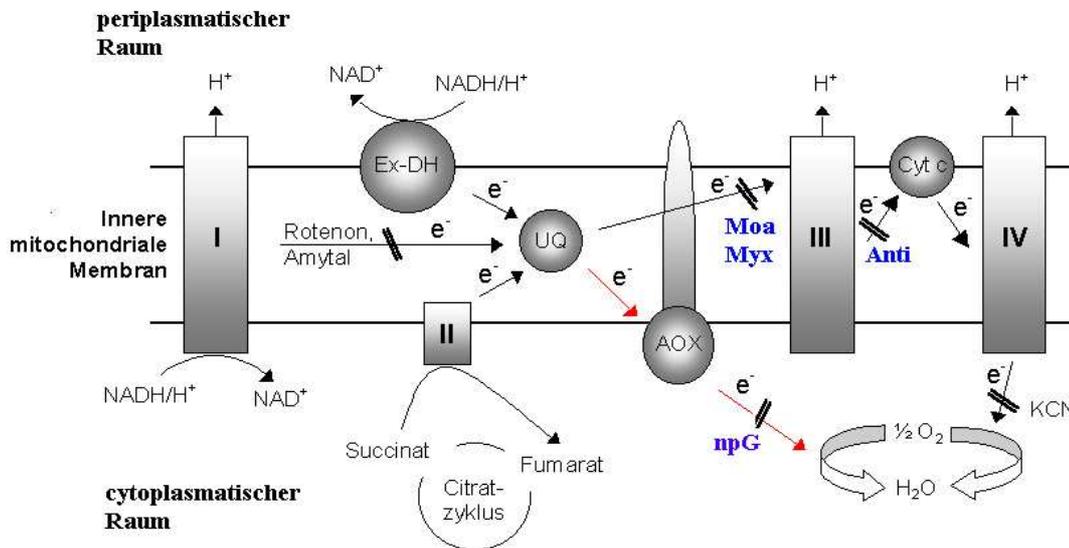
*coxII*-Gen in den Mitochondrien gänzlich. Die nukleäre Form des Gens übernimmt damit vollständig die Funktion des ursprünglich mitochondrialen Gens.

Die bei höheren Pflanzen in den Mitochondrien kodierten mt-Proteine, die nicht in den Zellkern inkoooperiert wurden, gehören fast ausschließlich zu den 4 Untereinheiten des Atmungskettenkomplexes. Es handelt sich dabei um Proteine, die verantwortlich für den membranassoziierten Elektronentransport sind. Man vermutet heute, dass die Strukturproteine der Elektronentransportketten in den Organellen synthetisiert werden. Dabei soll die Wahrnehmung des Oxidationszustandes der Membran im Organell erfolgen, um eine physiologisch adäquate Genregulation zu gewährleisten. Gestützt wird diese Vermutung durch Analysen bei einigen Protisten (*Microsporidia*, *Parabasalia*, *Trichomona*). Bei ihnen fehlt ein membrangebundener Elektronentransport. Sie können ihre ATP-Produktion durch einfache anaerobe Fermentation gewinnen (Clark und Roger, 1995; Germot et al., 1997; Hirt et al., 1997; Roger et al., 1998; Hashimoto et al., 1998). Ihre Mitochondrien bzw. Hydrogenosomen wurden komplett reduziert.

### 1.2.1 Die mitochondriale Atmungskette

Die Atmungskette der Mitochondrien ist aus vier Komplexen aufgebaut, mit deren Hilfe Elektronen von NADH/H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub> auf Sauerstoff übertragen werden. Die pflanzliche Atmungskette unterscheidet sich hinsichtlich der tierischen durch das Vorkommen zweier zusätzlicher, alternativer Wege zur Oxidation der Reduktionsäquivalente. Zum einen besitzen pflanzliche Mitochondrien eine NAD(P)H-Dehydrogenase, welche an der Cytosol-Seite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist („externe“ Dehydrogenase). Ihre Funktion ist nach wie vor ungeklärt, es wird aber angenommen, dass sie an der physiologischen Wärmeproduktion (Thermogenese) beteiligt ist und einige Gene lichtabhängig exprimiert werden (Svensson und Rasmusson (2001)). Der zweite alternative Weg in den pflanzlichen Mitochondrien ist der cyanidresistente Elektronentransport. Über diesen Weg werden Elektronen vom Ubichinon -Pool nicht über Komplex III und IV auf den Sauerstoff übertragen, sondern direkt mit Hilfe der alternativen Oxidase (eigentlich Ubichinon-Sauerstoff-Oxidoreduktase). In der Regel verläuft die Endoxidation der Reduktionsäquivalente (NADH/H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub>) über den „normalen Weg“, d.h. Cytochrom *b* und *c<sub>1</sub>* in Komplex III dehydrogenieren das reduzierte Ubichinon: die Elektronen werden über Cytochrom *c* zur Cytochrom-Oxidase auf den molekularen Sauerstoff übertragen. Die Funktion der alternativen Oxidase in der Atmungskette pflanzlicher Mitochondrien ist noch weitgehend ungeklärt, es wird aber vermutet, dass dieser Weg als eine Art „Überlaufventil“

aus einem reduzierten (gesättigten) Ubiquinonpool dient und ebenfalls an der Thermogenese beteiligt ist (Ito, 1999; Seymour und Schultze-Motel, 1999).



**Abb. 1.1 Modell der Atmungskette in pflanzlichen Mitochondrien.** AOX alternative Oxidase, Ex-DH externe Dehydrogenase, Cyt c Cytochrom c,  $e^-$  Elektronen, UQ Ubiquinon, **Anti** Antimycin A, **nPG** n-Propyl-Gallat, **Moa** E- $\beta$ -Methoxyacrylat, **Myx** Myxothiazol, KCN Kalium-Cyanid, I-IV Komplexe I-IV der Atmungskette. Der cyanidresistente Elektronentransport ist **rot** eingezeichnet. (verändert nach Schopfer und Brennicke, Pflanzenphysiologie)

### 1.2.2 Mechanismen von Atmungsketteninhibitoren

Der Elektronentransport in der Atmungskette kann durch eine Reihe von Substanzen gehemmt werden, die üblicherweise als Atmungsketten-Inhibitoren bezeichnet werden (Abb.1.1). Als wirksame Hemmstoffe von Komplex I haben sich Rotenon, Amytal und Barbiturate erwiesen. Diese Hemmstoffe unterbrechen den Elektronentransport der Atmungskette vollständig, was den Zelltod zur Folge hat, da die Elektronen aus der Succinat-Oxidation nicht zum Aufbau eines Membranpotentials ( $\Delta p$ ) und zur ATP-Bildung ausreichen. Antimycin A, Myxothiazol, Methoxyacrylat-Inhibitoren wie z.B. Strobilurine oder Chinon-Analoga verhindern die Übertragung der Elektronen auf Cytochrom c. Sie hemmen als allosterische Inhibitoren den Elektronentransport von Cytochrom b zu Cytochrom  $c_1$  im Komplex III der mitochondrialen Atmungskette. Cyanid, Sulfid und Kohlenmonoxid verhindern die Elektronenübertragung auf den Sauerstoff im Komplex IV der Atmungskette. Durch den cyanidresistenten Elektronentransport können jedoch beide Inhibitormöglichkeiten umgangen werden. Obwohl die cyanidresistente Atmung nicht zum

Aufbau eines  $\Delta p$  und zur ATP-Bildung beiträgt, kann ein - wenn auch nur sehr geringes - Membranpotential über Komplex I aufgebaut werden. Es kommt somit zu keinem Elektronenstau in der Atmungskette. Zellen, die so inhibiert werden, sind sehr stark in ihrem Wachstum eingeschränkt.

Der cyanidresistente Elektronentransport kann durch n-Propyl-Gallat (nPG), Benzolhydroxaminsäure (BHAM) bzw. Salicylhydroxaminsäure (SHAM) unterbrochen werden (Pirson et al., 1985; Sluse und Jarmuszkiewicz, 1998; Sluse et al., 1998). Sie binden an die alternative Oxidase und hemmen so den Transport der Elektronen aus dem Ubiquinonpool zum Sauerstoff. Die Inhibition der alternativen Oxidase allein hat keinen direkten Einfluss auf den Aufbau eines  $\Delta p$  und die ATP-Bildung und beeinflusst daher das Zellwachstum nur in geringem Maße. So soll die Kapazität der cyanidresistenten Atmung in der Regel bei 5 bis 10 % der gesamten Atmung liegen, was anhand von Mitochondrien aus jungen Tabakblättern gezeigt werden konnte (Håkansson et al., 1990). Bei der Stressantwort oder zu Bestäubungszwecken (z.B. bei Aronstabgewächsen) kann es zu einem wesentlich höheren Anteil der cyanidresistenten Atmung kommen (Pörs, 1999).

Das Apocytochrom *b* Gen (in dieser Arbeit als *cob*-Gen bezeichnet) ist als Gen des membranassoziierten Elektronentransportes bei vielen Organismen stark konserviert (Sicheritz-Pontén et al., 1998). Aus Untersuchungen zum Atmungskettenkomplex (s.u.) ist bekannt, dass spezifische Punktmutationen im *cob*-Gen Resistenzen gegenüber mitochondrialen Hemmstoffen verleihen.

Die resistenzverleihenden Punktmutationen, liegen in drei Regionen des *cob*-Gens. Zwischen den Aminosäurepositionen 31-43 liegt eine Domäne für die Antimycinresistenz. Eine Resistenz gegenüber Antimycin wird unter anderem bei *Chlamydomonas reinhardtii* (Bennoun et al., 1991), *Saccharomyces cerevisiae* (Burger et al., 1975, 1976; Michaelis und Pratje, 1977; Di Rago und Colson, 1988), *Kluyveromyces lactis* (Brunner et al., 1987; Coria et al., 1989) und bei Mausmitochondrien beschrieben (Howell und Gilbert, 1988). Bei allen konnte eine stark konservierte Antimycindomäne identifiziert werden. Ein Aminosäureaustausch von Alanin bzw. Glycin durch Valin führt dabei zu einer Resistenz gegenüber Antimycin (Weber und Wolf, 1988).

Für Myxothiazol und E- $\beta$ -Methoxyacrylat-Inhibitoren sind mehrere konservierte Bereiche bekannt. Die am häufigsten beschriebenen Domänen liegen zwischen den Aminosäurepositionen: 129-153 und 252-276. Resistenzen gegenüber Myxothiazol und E- $\beta$ -Methoxyacrylat-Inhibitoren sind bei mehr als 19 Spezies beschrieben worden (Howell und Gilbert, 1988; Di Rago et al., 1989; Esposti et al., 1990; Tron und Lemesle-Meunier, 1990;

Bennoun et al., 1991, 1992; Geier et al., 1992; Tokito und Daldal, 1993; Giessler et al., 1994). Alle aufgeführten Aminosäuresubstitutionen bewirken eine Veränderung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur von Cytochrom *b*. Die Inhibitoren sind damit nicht mehr in der Lage, an dieser Stelle an den Cytochrom *b*-Komplex zu binden. Es kommt zu einer erhöhten Toleranz (in dieser Arbeit als Resistenz bezeichnet) gegenüber diesen Inhibitoren. Die Elektronentransportkette wird in diesem Fall nicht unterbrochen. Bei höheren Pflanzen konnten bisher noch keine mitochondrialen Mutanten gefunden werden, die vergleichbare Punktmutationen aufweisen. Es ist aber aufgrund der sehr starken Konservierung der resistenzverleihenden Domänen möglich, dass die beschriebenen Punktmutationen auch bei höheren Pflanzen zu einer Resistenz gegenüber diesen Inhibitoren führen. In Tab. 1.1 sind Beispiele für Aminosäureveränderungen an den Positionen 43, 135 und 137 aufgeführt, die zu Resistenzen gegenüber Antimycin, Myxothiazol und E- $\beta$ -Methoxyacrylat führen.

**Tab. 1.1 Resistenzverleihende Aminosäureveränderungen innerhalb des *cob*-Gens.** Grundlage für die Bestimmung der Aminosäureposition ist *Nicotiana tabacum*. Zwischen den Organismen kann es zu Verschiebungen der Aminosäurepositionen kommen.

Organismen	Position der Aminosäureveränderung	Art der Aminosäureveränderung	vermittelte Resistenz
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	135	Phenylalanin → Leucin	Myx/Moa
	137	Glycin → Serin	Myx/Moa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43	Glycin → Valin	Antimycin
	135	Phenylalanin → Leucin	Myx/Moa
	137	Glycin → Arginin/Glutaminsäure	Myx/Moa
<i>Schizosaccharomyces Pombe</i>	135	Glycin → Phenylalanin	Myx/Moa
<i>Venturia inaequalis</i>	135	Glycin → Phenylalanin	Myx/Moa
<i>Neurospora crassa</i>	135	Glycin → Phenylalanin	Myx/Moa
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	135	Glycin → Leucin	Myx/Moa
<i>Maus</i>	43	Glycin → Valin	Antimycin

### 1.2.3 Mitochondrientransformation

Bis heute ist es bei zwei Organismen gelungen, das mitochondriale Genom zu transformieren. In beiden Fällen wurden Defektmutanten kuriert, die Deletionen im Bereich der Atmungskette besaßen. Johnston et al. gelang 1988 die erste Mitochondrientransformation bei *Saccharomyces cerevisiae*. Von Vorteil war dabei, dass sowohl das Kerngenom als auch das mitochondriale Genom sehr gut charakterisiert waren. Zusätzlich existierte eine Vielzahl von mitochondrialen Mutanten, bei denen das *oxi3*-Gen der Atmungskette deletiert war, was zur Folge hatte, dass sie nur anaerob wachsen konnten. Zur Transformation wurde eine Mutante ausgewählt, die eine 2547 Bp Deletion im *oxi3*-Gen besaß. Das *oxi3*-Gen kodiert für die größte Untereinheit der Cytochromoxidase (*coxI*-Gen). Als Transformationskonstrukt wurde ein Wildtyp (WT)-Fragment des *oxi3*-Gens benutzt, das nach homologer Rekombination in das Mitochondrium integriert wurde um den Defekt zu kurieren. Um die Transformationseffizienz zu steigern, wurde eine Co-Transformation durchgeführt. Der zweite Vektor enthielt das *URA3*-Gen, welches beim Wildtyp im Kern lokalisiert ist und in der Mutante nicht funktionsfähig ist. Aus den ca. 6300 selektierten Kerntransformanten konnten sechs mitochondriale Transformanten im zweiten Selektionsschritt isoliert werden. Die Selektion erfolgte unter aeroben Bedingungen, d.h. die Transformanten besaßen einen funktionsfähigen Atmungskettenkomplex. Durch molekularbiologische Charakterisierung der Transformanten konnte gezeigt werden, dass das WT-Fragment des *oxi3*-Gens korrekt durch homologe Rekombination eingefügt wurde. Eine homologe Integration von Fremd-DNA in das Mitochondriengenom von *Saccharomyces cerevisiae* mit den gleichen Selektionsmechanismen konnte von Fox et al. (1988) gezeigt werden.

Bei *Chlamydomonas reinhardtii* konnte Randolph-Anderson et al. (1993) eine dark-uniparental-minus (*dum1*)-Mutante durch Mitochondrientransformation kurieren. Diese besaß eine 1500 Bp-Deletion im Bereich des *cob*-Gens, was zur Folge hatte, dass sie nicht in Dunkelheit auf acetathaltigem Nährmedium als Kohlenstoffquelle wachsen konnte. Die Mutanten wurden mit Vektoren transformiert, die Wildtypfragmente von *Chlamydomonas reinhardtii* bzw. *Chlamydomonas smithii* enthielten. Nach 4-8 Wochen Dunkelinkubation auf acetathaltigem Nährmedium konnten insgesamt 23 Transformanten selektiert werden. Alle Transformanten enthielten das 1500 Bp-Fragment, das bei den *dum1*-Mutanten fehlt.

Eine Mitochondrientransformation bei höheren Pflanzen ist bis jetzt noch nicht beschrieben worden. Es gibt zwar weltweit zahlreiche Forschergruppen, die sich mit dieser Thematik beschäftigen (z.B. Arbeitsgruppen Bock, Chase, Köhler, Lührs, Mulligan, Neumann), eine stabile Integration eines Transgens ist jedoch bisher nicht gelungen. Problematisch sind neben

einer geeigneten Wahl der Zielpflanzen und des Zielgewebes, auch die schlechten Regenerationseigenschaften vieler pflanzlicher Gewebearten sowie die unzureichenden Sequenzkenntnisse des mitochondrialen Genoms zu sein. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Auswahl von geeigneten mitochondrialen Markern zur Selektion von Transformanten. Offenbar scheint aber auch die stabile Integration von Transgenen in das Mitochondriengenom bzw. deren Nachweis Probleme zu bereiten. In einem Teil dieser Arbeit werden deshalb verschiedene Ansätze zur Transformation pflanzlicher Mitochondrien durchgeführt.

### 1.3 Plastidäre Genomorganisation

Die Reduktion des Chloroplastengenoms bei höheren Pflanzen ist im Vergleich zu den mitochondrialen Genomen sehr einheitlich verlaufen. Die frei lebenden Vorfahren der Chloroplasten kodierten ca. 2000-3000 Proteine in ihrem Genom, was vergleichbar mit dem Cyanobakterium *Synechocystis* ist. Die Plastiden höherer Pflanzen benötigen zum Aufbau ihrer Funktionskomplexe eine ähnliche Anzahl an Proteinen, wovon aber nur ein kleiner Teil von ca. 80 Proteinen im Organell selbst kodiert wird (Shinozaki et al., 1986; Hiratsuka et al., 1989; Wakasugi et al., 1994). Ausnahmen sind bei manchen Algen zu finden, deren Plastiden eine Kodierungskapazität von bis zu 200 Proteinen besitzen. Bei den Plastiden des Humanpathogens *Plasmodium falciparum* sind nur 20 Proteine im Organell kodiert. Durch die Sequenzierung zahlreicher Chloroplastengenome höherer Pflanzen (zur Zeit 17 komplett sequenzierte Genome, z.B. Tabak: Shinozaki et al., 1986; Reis: Hiratsuka et al., 1989; Mais: Maier et al., 1995; Weizen: Ogihara et al., 2002; *Medicago truncatula*: Lin et al., 2003; siehe auch Gobase- und Megasun Datenbank unter <http://alice.bch.umontreal.ca/genera/chbase/gobase.html> und [http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/other/cp\\_list.html](http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/other/cp_list.html)) konnten die Genomstrukturen bereits gut analysiert werden. Typische Plastome höherer Pflanzen besitzen eine einheitliche Größe zwischen 120 und 160 kBp und sind zirkulärer Struktur. Bei vielen Spezies sind die Gene in einem kleinen und einem großen in einfacher Kopie vorkommenden Genomabschnitt angeordnet, („small single copy region“ und „large single copy region“) und werden jeweils durch einen in doppelter Ausführung vorhandenen „inverted repeat“-Bereich getrennt. Das Plastom liegt in bis zu 100 Kopien pro Plastide vor, so dass in chloroplastenreichen Zelltypen wie einer Mesophyllzelle ein Ploidiegrad von  $n = 10.000$  erreicht werden kann. Die Plastommoleküle sind in als Nukleoid bezeichneten Strukturen unterschiedlicher Anzahl, Größe und Ploidie im Stroma eingebettet. Proplastiden haben oft nur ein Nukleoid mit einem DNA-Molekül, während reife Chloroplasten 10 bis 20 Nukleoide mit jeweils mehreren Plastom-Kopien (bis über 12) enthalten (Kowallik und

Herrmann, 1972; Kuroiwa et al., 1981). Das Plastom wird in den meisten höheren Pflanzen uniparental maternal vererbt (z.B. Tabak), obwohl Ausnahmen bekannt sind (z.B. *Oenothera*, *Daucus*). Ähnlich wie bei den Mitochondrien sind auch in den Plastiden vornehmlich Gene im Genom verblieben, die an den Prozessen des Elektronentransports, der daran gekoppelten ATP-Synthese und an der Synthese der dazu benötigten Proteine beteiligt sind. So sind beispielsweise von 46 Proteinen, die allen photosynthetisch aktiven Plastiden gemeinsam sind, 44 direkt am membranassoziierten Elektronentransport oder deren Synthese beteiligt. Des Weiteren kodieren die Gene des Plastoms für alle benötigten tRNAs und rRNAs (16SrDNA, 23SrDNA, 4.5SrDNA, 5SrDNA). Im Tabakplastom konnten nur 30 verschiedene tRNA-Gene identifiziert werden. Nach der Standard-„Wobble-Hypothese“ werden zur Erkennung aller Codons mindestens 32 unterschiedliche tRNAs benötigt. Da es als wahrscheinlich gilt, dass kein tRNA-Import vom Zellkern erfolgt, wird vermutet, dass aufgrund erweiterter „Wobble-Paarungen“ („U:N wobble“) jeweils eine tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Ala</sup> und tRNA<sup>Arg</sup> alle vier Prolin-, Alanin- und Arginin-Codons erkennen kann (Sugiura, 1987).

Die DNA-Synthese in den Plastiden soll nicht mit der im Kern gekoppelt sein (Possingham und Rose, 1976) und findet offenbar bevorzugt im Licht statt (Herrmann, 1992). Die plastidäre Genexpression unterliegt überwiegend der Kontrolle des Zellkerns. Dies wird durch eine Vielzahl von in die Plastiden importierten, kernkodierten Regulationsfaktoren und Enzymen erreicht (Sugita und Sugiura, 1996). Wie Expressionsstudien belegen, kommt neben der Transkriptionskontrolle den post-transkriptionellen Prozessen im genetischen Kompartiment der Plastiden eine zentrale Bedeutung zu (Deng und Gruissem, 1987). Dabei zeigt sich, dass bei der Transkriptionskontrolle die Aktivität aller Gene vorwiegend gleichzeitig gesteuert wird, was sich beispielsweise während der Plastidendifferenzierung oder bei Licht/Dunkel-Übergängen widerspiegelt. Hingegen ermöglichen post-transkriptionelle Mechanismen bevorzugt eine differentielle Expression einzelner Gene. Zu solchen post-transkriptionellen Mechanismen gehören: die Bildung der „maturen“ Transkriptenden (Nickelsen und Link, 1993), die Prozessierung von polycistronischen Transkripten (Westhoff und Herrmann, 1988), mRNA-Edierung (Bock et al., 1996), Spleißen von Introns (Barkan, 1989), Regulation des „mRNA-turnovers“ (Mullet und Klein, 1987; Kim et al., 1993) sowie die Kontrolle der Translationseffizienz (Danon, 1997, Eibl et al., 1998; Zerges, 2000). Auf Proteinebene werden durch weitere Kontrollvorgänge wie reversible Phosphorylierungen (Kruse et al., 1997) oder proteolytischen Abbau (Kim et al., 1994) die Menge an enzymatisch aktivem Protein den aktuellen Bedürfnissen angepasst. Diese recht umfangreichen Regulierungsmechanismen machen deutlich, wie komplex die Aufgaben der

Plastiden „geworden“ sind. Der in den Chloroplasten lokalisierte Calvin-Zyklus besitzt z.B. eine chimäre Zusammensetzung von Proteinen, die cyanobakteriellen und proteobakteriellen Ursprungs sind (Martin und Schnarrenberger, 1997). Es konnte sich somit ein hochspezifisches und effizientes Netzwerk neu kompartimentieren.

Mit Hilfe der Plastidentransformation ist es seit 1988 möglich, Chloroplasten zu transformieren (Boynton, et al., 1988). Mit ihrer Hilfe kann die Regulation dieser hochspezifischen interaktiven Netzwerke z.B. auch durch plastidäre „knock-out“-Mutanten näher charakterisiert werden (z.B. Kofer et al., 1998; De Santis-Maciossek et al., 1999).

### 1.3.1 Plastidentransformation

Die erste stabile Transformation von Chloroplasten wurde durch die ballistische Methode mittels „particle gun“ bei Defektmutanten der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* erzielt (Boynton et al., 1988; Blowers et al., 1989). Dabei wurden aufgrund eines Defektes im plastidären *atpB*-Gen photosynthetisch inaktive *Chlamydomonas*-Zellen mit Mikroprojektilen beschossen, die mit einer Wildtypkopie des *atpB*-Gens beladen waren. Eine Selektion erfolgte auf autotrophes Wachstum. 1990 berichteten Svab et al. (1990) über die erste Plastidentransformation einer höheren Pflanze. Sie konnten ein mutantes, spectinomycin- und streptomycinresistenz verleihendes 16S rDNA-Fragment in die plastidäre DNA von *Nicotiana tabacum* inserieren. Einen wesentlichen Fortschritt bei der Plastidentransformation konnte Goldschmidt-Clermont (1991) bei *Chlamydomonas* durch Verwendung des selektierbaren Markers *aadA* (kodiert für Aminoglykosid-3‘-Adenyltransferase; „AADA-Protein“) erzielen. Das aus *E. coli* stammende *aadA*-Gen verleiht Resistenz gegen die an die 70S-Ribosomen angreifenden Aminoglykosid-Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin, indem das AADA-Protein die Inhibitoren durch Adenylierung inaktiviert, so dass diese nicht mehr an das Zielmolekül binden können. Durch weitere Transformationsexperimente bei *Nicotiana tabacum* wurde gezeigt, dass plastomhomologe DNA-Sequenzen von über 6 kB durch Rekombination stabil in das Plastom eingebaut werden können (Staub und Maliga, 1992). Durch Selektion resistenter Linien auf antibiotikahaltigem Medium konnten die Anzahl der Wildtyp-Plastommoleküle“ so weit minimiert werden, bis die Pflanzen „homoplastomisch“ oder nahezu homoplastomisch für das rekombinante Plastidengenom waren. Unterstützt wurde dieser auf Segregation beruhende Vorgang durch wiederholte Regenerationszyklen. Befand sich die Zielsequenz der Transformation im „inverted repeat“, so enthielten nach der Selektion beide „inverted repeat“-Bereiche das rekombinante Fragment. Dieses Phänomen wird als „copy correction“ bezeichnet und dürfte eine Folge von Rekombinationsereignissen zwischen den beiden Plastidenregionen sein. Dieses Selektionssystem konnte erfolgreich auf

die Plastidentransformation von *Nicotiana tabacum* übertragen werden (Svab und Maliga, 1993; Golds et al., 1993). Im Vergleich zur Transformation mit einem mutierten 16S rDNA-Fragment konnte bei einer Transformation mit dem *aadA*-Gen und Selektion auf Spectinomycin/Streptomycin eine um bis zu zwei Größenordnungen höhere Transformationseffizienz erzielt werden. Die Verwendung der Transformationskassette mit einem *aadA*-Gen kann wie sich gezeigt hat, zum effizienten Einschleusen eines oder mehrerer „Transgene“ in das Plastidengenom benützt werden (Svab und Maliga, 1993; Golds et al., 1993; Eibl et al., 1999). In jedem Fall muss die „Transgen-Kassette“ von homologen plastidären Sequenzen aus dem Zielort flankiert sein und geeignete plastidäre Regelelemente tragen. Es war nun möglich, durch geeignete Auswahl von zum Plastom homologer Vektorbereiche Fremdgene an verschiedene Orte im Lokus des Plastoms zu inserieren sowie plastidäre Gene durch Gendisruption gezielt zu inaktivieren oder gegen eine rekombinante Kopie auszutauschen.

Mit der Plastidentransformation höherer Pflanzen ist es nicht nur möglich, das Zusammenspiel von Kern- und Plastomexpression zu charakterisieren sowie Funktionen plastidärer Gene zu analysieren, sondern auch mögliche biotechnologische Anwendungen zu erproben. Dabei bietet die Plastidentransformation zahlreiche, zum Teil entscheidende Vorteile gegenüber der Transformation des Zellkerns. Der hohe Ploidiegrad des Plastoms ermöglicht eine extrem hohe Fremdproteinakkumulation. Dies bedeutet, dass man durch Transformation des Plastoms die 10 bis 100fache Menge rekombinanten Proteins im Vergleich zur Kerntransformation erreichen kann (De Cosa et al., 2001). Zudem besitzen die Chloroplasten in ihrem Stroma weniger effiziente Mechanismen des Proteinabbaus als im Cytoplasma, was zu einer größeren Stabilität vieler Proteine führen kann (Adams und Stern, 1990). Die Möglichkeit, das Transgen durch homologe Rekombination an einem gezielten Lokus in das Plastom zu integrieren, bietet gegenüber Kerntransformationen, bei denen ein Einbau von Transgenen durch homologe Rekombination noch nicht routinemäßig erfolgt (Shalev et al., 1999), den Vorteil, dass es zu keinerlei Positionseffekten bzw. „gene-silencing“ kommen kann. Durch mehrere Zyklisierungsschritte auf selektivem Medium können homoplastomische Transformanten erhalten werden. Solche plastidäre Transformanten zeichnen sich im Idealfall durch eine hohe und einheitliche Expression des gewünschten Proteins aus. Bei Kerntransformationen kommt es häufig zur mehrfachen Integration des Transgens, was bewirken kann, dass die Expression des gewünschten Proteins sehr stark variiert. Die bei den Pflanzen meist strikt maternale Vererbung des Plastoms ist zudem eine wichtige ökologische Komponente in Bezug auf eine transgene Kontamination der Umwelt.

Durch die maternale Vererbung ist es weitgehend ausgeschlossen, dass das Transgen durch den Pollen weiterverbreitet wird. Die Gefahr der unbeabsichtigten Kontamination von Wildspezies durch transgenen Pollen, wie sie bei Kerntransformationen immer besteht, ist somit sehr gering. Eine Verbreitung von Antibiotikumresistenzgenen durch horizontalen Gentransfer kann bei Kern- und Plastidentransformationen durch Elimination des Markergens mit dem *CRE-lox*-spezifischem Rekombinationssystem oder dem Flp-*FRT*-System verhindert werden. Beim *CRE-lox*-spezifisches Rekombinationssystem wird das Markergen von zwei *loxP*-transposonähnlichen Sequenzen umgeben. Die *CRE*-Rekombinase erkennt die Sequenzen und ermöglicht durch homologe Rekombination der *lox*-Sequenzen die Elimination des dazwischenliegenden Markergens (Sternberg et al., 1981; Dale und Ow, 1991; Gleave et al., 1999; Hajdukiewicz et al., 2001; Corneille et al., 2001). Beim Flp-*FRT*-System werden die *FRT*-Sequenzen von einer Flp-Rekombinase erkannt und ebenfalls durch homologe Rekombination ausgeschnitten (Sanchis et al., 1997). Eine Nutzung des Flp-*FRT*-System für Plastidentransformationen ist bisher jedoch noch nicht beschrieben. Viele Merkmale, die man durch genetische Manipulation verändern möchte, werden nicht nur von einem Gen kodiert, sondern von einer ganzen Reihe von Genen. Typische Kerngene liegen in einfacher Kopie auf dem Chromosom und werden individuell transkribiert. Chloroplastengene sind aber häufig in Operons organisiert, die gemeinsam transkribiert werden. Diese Eigenschaft kann man sich bei der Plastidentransformation zu Nutze machen. Mehrere Gene (z.B. für bestimmte Enzyme eines Stoffwechselweges) mit vergleichbar starken Regelementen können gleichzeitig in das Plastidengenom eingeführt werden. Die rekombinanten Enzyme können somit in den gleichen stöchiometrischen Verhältnissen bereitgestellt werden.

Bei den oben aufgeführten positiven Eigenschaften von Plastidentransformationen wird deutlich, welches biotechnologische Potenzial Plastidentransformationen besitzen können (Zusammenfassung in Hager und Bock, 2000; Bogorad, 2000; Bock, 2001; Daniell und Dhingra, 2002). Im Folgenden werden einige Anwendungsmöglichkeiten näher beschrieben.

## Anwendungsmöglichkeiten für Plastidentransformationen

- **Pflanzenschutz**
- **Produktion von Biorohstoffen**
- **Modifikation der Stoffwechselwege**
- **Pharmazeutische Nutzung**
- **Veränderung von qualitativen und quantitativen Eigenschaften**

Im Bereich des Pflanzenschutzes ist eine Bekämpfung von bakteriellen, viralen und pilzlichen Erregern sowie eine effiziente Unkrautkontrolle und Insektenabwehr unvermeidbar. Durch Plastidentransformation mit dem veränderten kernkodierten plastidären Gen für das Enzym 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat Synthase (EPSPS) konnte bereits eine 10fach erhöhte Toleranz gegenüber dem Herbizid Glyphosat (Roundup®) bei Tabak erreicht werden (Daniell et al., 1998; Ye et al., 2001). Das aus drei Molekülen bestehende Peptid Bialaphos wird von im Boden lebenden Streptomyeten-Arten produziert und nach außen abgegeben, um die Nahrungskonkurrenz fernzuhalten. Herbizider Wirkstoff ist die Aminosäure Phosphinothricin. Das *bar*-Gen, welches die Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) kodiert, konnte in das Tabakplastom integriert werden. In der löslichen Proteinfraction konnten bis zu 7 % PAT gemessen werden, was zu einer hohen Resistenz gegenüber dem synthetisch hergestellten Herbizid DL-Phosphinothricin führt. Eine mögliche Verbreitung des *bar*-Gens durch Pollen auf Wildspezies könnte somit durch die Anwendung der Plastidentransformation verhindert werden. Eine weitere Nutzung des *bar*-Gens als plastidärer Selektionsmarker war nicht möglich.

Von dem grampositiven Bakterium *Bacillus thuringiensis* sind Toxine bekannt, die als Insektenpathogen genutzt werden können. Das Toxin wirkt dabei auf die Darmepithel der Insekten. Es wurden bereits zahlreiche Gene charakterisiert, deren Toxine eine unterschiedliche Spezifität besitzen. Seit 1995 sind kerntransformierte Bt-resistente Kartoffel-, Baumwoll- und Maissorten zugelassen (mit den Genen *Cry3a*, *CryIAc* und *CryIAb*). Zur Plastidentransformation wurden die Bt-Toxin-Gene *CryIAc* und *Cry2Aa2* in das Plastidengenom von Tabak inseriert. Es konnten dadurch 3-5 % des Bt-Toxin in der löslichen Proteinfraction erreicht werden. Die Menge des Bt-Toxin ist entscheidend für eine effiziente Pathogenabwehr. Durch Anpassung der Gene an die plastidäre Transkription und

Translation konnte die Expression des Bt-Toxin auf über 40 % in der löslichen Proteinfraction gesteigert werden. Bei homoplastomischen Tabaktransformanten konnte eine deutliche Resistenz gegen die Pathogene beobachtet werden (McBride et al., 1995; Kota et al., 1999; De Cosa et al., 2001).

Im Bereich Biorohstoff, ist die Produktion von Polyhydroxyfettsäuren (PHF, PHA) ein vielversprechendes Einsatzgebiet. Sie besitzen thermoplastische Eigenschaften, sind biologisch abbaubar und aus nachwachsenden Rohstoffen herstellbar. Sie werden als Reservestoffe von Mikroorganismen produziert und gespeichert, wenn genügend Kohlenstoffquellen wie Zucker vorhanden sind. Bei Bedarf dienen sie als Reserve- oder Speicherstoffe sowie als Energiequelle. Durch Auswahl geeigneter Bakterienstämme gelangt man biotechnologisch zu Polyestern, die zur Herstellung von Folien- und Verpackungsmaterial und zur Anwendung in der Medizin herangezogen werden können. Die Synthese von PHA's konnte durch Kerntransformationen mit Genen aus *Ralstonia eutropha* mit anschließendem Export der Proteine in die Chloroplasten getestet werden (Nawrath et al., 1994; Slater et al., 1999; Houmiel et al., 1999). Die Ausbeute von PHA's schwankte zwischen 1,6-14 % in der Trockenmasse von Arabidopsisblättern. Bei der Transformation von Tabakplastiden zur Produktion von Polyhydroxybuttersäure (PHB) mit den Genen *phbA*, *phbB* und *phbC* konnte bisher ein Gehalt von bis zu 2,4 % PHB in der Trockenmasse von Tabakblättern erreicht werden (Lössl et al., 2003). Da die Akkumulation von PHB während der Regenerationsphase der Transformanten einen negativen Einfluss auf Wachstumseigenschaften ausübt, soll in weiteren Experimenten ein im Zellkern lokalisiertes T7-Polymerase Gen mit einer plastidären Importsequenz, welches unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht, eingesetzt werden (McBride et al., 1994). Durch einen solchen induzierbaren Promotor ist es möglich, die Produktion von PHB zu einem gewünschten Zeitpunkt zu aktivieren.

In (noch) weiter Ferne ist die biotechnologische Nutzung der aus agronomischer Sicht äußerst interessanten Stoffwechselwege der Stickstofffixierung und der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Fixierung. Durch eine plastidäre genetische Veränderung dieser Stoffwechselwege könnte es möglich werden, einerseits die Photosyntheserate zu steigern, was zu einer höheren nutzbaren Pflanzenproduktion führen würde, andererseits könnte der Mechanismus der Stickstofffixierung zu einer drastischen Verringerung der Düngemittelkosten führen, wenn man Pflanzen, die diesen Mechanismus nicht besitzen, gezielt verändern könnte. Eine australische Gruppe transformierte vor kurzem Tabakpflanzen mit dem Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase-Gen (*RuBisCO*-Gen) der roten Alge *Rhodospirillum rubrum*. Die Tabaktransformanten zeigten wie

erwartet eine deutlich geringere Photosyntheserate. Es konnte mit diesen Versuchen erstmals gezeigt werden, dass es möglich ist, mit Hilfe der Plastidentransformation regulatorisch in den Photosyntheseapparat einzugreifen (Whitney und Andrews, 2001).

Daneben könnte auch eine Vielzahl pharmazeutischer Produkte durch genetisch veränderte Plastiden hergestellt werden. Beispiele sind die Herstellung von (pro-) Vitaminen, Antikörpern (plantibodies), Anticalinen, therapeutischen Proteinen oder Fettsäuren in Pflanzen. Die erste kommerzielle Antikörperproduktion in den Plastiden von *Chlamydomonas* (Dutton, 1999) zeigt, dass auf dem Gebiet der Antikörper- und wohl auch der Anticalinproduktion (Moleküle mit antikörperähnlichen Eigenschaften) mit einem enormen Potential zu rechnen ist. Das Gen für Somatotropin (STH), einem menschlichen Wachstumshormon, das normalerweise im vorderen Teil der Hirnanhangdrüse (Hypophyse) gebildet wird, konnte in den Plastiden von Tabak korrekt translatiert werden. Es wurden bis zu 7 % Somatotropin in der gesamten löslichen Proteinfraction in biologisch aktiver Form akkumuliert (Staub et al., 2000).

Die biotechnologische Produktion von Aminosäuren, insbesondere die von essentiellen, ist ein weiterer Bereich, welcher sich der Plastidentransformation erschließt. Aminosäuren werden vom Organismus vorwiegend als Proteinbausteine benötigt, nehmen aber auch in freier Form wichtige Funktionen wahr, z.B. als Katalysatoren für Biosynthesen oder Lieferanten für funktionelle Gruppen. Neben den wichtigsten 20 proteinogenen Aminosäuren gibt es weitere Vertreter mit geringerer Verbreitung. In pflanzlichen Organismen sind zur Zeit mehr als 200 nichtproteinogene Verbindungen bekannt. Pflanzliche Organismen sind dabei für den Menschen und für viele Tiere die wichtigste Quelle der essentiellen Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan, Methionin, Threonin und Lysin. Die Synthesewege dieser Aminosäuren sind bei Menschen und Tieren nicht vorhanden. Die herkömmliche biotechnologische Herstellung von Aminosäuren erfolgt entweder enzymatisch oder durch mikrobielle Fermentation. Die wirtschaftlich bedeutendsten, durch Fermentation hergestellten Aminosäuren sind L-Glutaminsäure-Natriumsalz als Geschmacksverstärker für die Nahrungsmittelindustrie mit ca. 800000 t, L-Lysin und DL-Methionin als Futtermittelzusatzstoff mit ca. 450000 t bzw. 250000 t und diverse L-Aminosäuren als Nahrungsmittelzusatzstoffe. Die Biosynthese vieler Aminosäuren wird durch eine sogenannte „feedback“-Regulation gesteuert. Eine solche Endprodukthemmung bewirkt, dass der Stoffwechselweg der Aminosäureproduktion durch das Produkt selbst ab einer bestimmten Konzentration gehemmt wird. Bei der mikrobiellen Produktion von Aminosäuren werden aus diesem Grund Organismen benutzt, die

regulatorische Defektmutationen besitzen, bei denen eine solche Endprodukthemmung inhibiert ist. Für die Produktion von Lysin ist das Bakterium *Corynebacterium glutamicum* von großer biotechnologischer Bedeutung. Das gram-positive, nicht pathogene und schnellwachsende Bodenbakterium wurde in den 50er Jahren in Japan als natürlicher Glutaminsäureproduzent entdeckt und wird heute neben der Produktion von Lysin auch zur Produktion von Threonin, Isoleucin und des Vitamins Pantothersäure benutzt (Fernández-González et al., 1996). Durch die komplette Sequenzierung von *Corynebacterium glutamicum* durch die BASF und ihren Kooperationspartner Integrated Genomics konnten nicht nur die Patentrechte an 1500 von 2900 bisher unbekannt Genen des *Corynebacterium glutamicum* angemeldet werden, sondern es konnte auch ein Gen charakterisiert werden, das an der Regulation des Lysinstoffwechsels beteiligt ist. Damit soll sich die fermentative Lysinproduktion mit dem Bakterium *Corynebacterium glutamicum* um bis zu 15 % steigern lassen.

Ein eleganter Weg, Lysin oder andere Aminosäuren zu produzieren, könnte die Plastidentransformation sein. Es wäre mit ihr möglich, gezielt solche Pflanzenarten genetisch zu manipulieren, die bei der Tierfutterproduktion verwendet werden und einen geringen Lysingehalt besitzen. Damit könnte auf die Verwendung von lysinhaltigen Futterzusatzstoffen und lysinreichem Tiermehl verzichtet werden. Ein sehr hoher Bedarf an Lysin besteht vor allem in der Schweine- und Geflügelmast. Mit wenigen Ausnahmen (z.B. Leguminosen, Reis, Buchweizen) ist der Lysingehalt in Pflanzen zu gering, um eine gesunde Tierernährung zu gewährleisten

Lysinmangel kann beispielsweise zu Wachstumsstörungen, Veränderung der Stickstoffbalance und zu geschwächten Abwehrfunktionen führen. Solche Mangelerscheinungen treten nicht nur bei Tieren auf, sondern auch bei Menschen, die in Ländern leben, in denen die Ernährung hauptsächlich aus lysinarmen Nahrungsmitteln (Getreide, Nüsse, Kartoffeln, etc.) besteht. In dieser Arbeit wird erstmals ein plastidärer Transformationsansatz verwendet, um den Gehalt von Lysin bei höheren Pflanzen zu erhöhen.

#### **1.4 Ziele und Ablauf dieser Arbeit**

Die vorliegende Arbeit untergliedert sich in zwei Bereiche. Der erste Themenbereich befasst sich mit der Transformation von pflanzlichen Mitochondrien bzw. mit den Voraussetzungen, die erfüllt sein müssen, um Mitochondrien höherer Pflanzen transformieren zu können. Im zweiten Themenbereich wird die Regulation des Biosynthesewegs der Aminosäure Lysin erstmals mit Hilfe der Plastidentransformation modifiziert. Neben einer erhöhten

Lysinproduktion soll ein neues antibiotikumfreies plastidäres Selektionssystem entwickelt und etabliert werden.

### 1.4.1 Mitochondrientransformation

Die stabile Transformation von Mitochondrien höherer Pflanzen ist Voraussetzung zur Klärung vieler offener Fragen bezüglich mitochondrialer Genfunktion, Genregulation und Genexpression sowie zum Studium der Interaktion der drei genetischen Kompartimente einer höheren Pflanzenzelle. Auch biotechnologische Anwendungen, wie sie für die Plastidentransformation beschrieben wurden (Kap. 1.4), sind durchaus denkbar. Dabei könnte der Eingriff in die Regulation des mitochondrialen Atmungskettenkomplexes, beispielsweise zur Erhöhung der Stoffwechsellistung, sinnvoll sein. Auch die vielfältigen Vorteile der Plastidentransformation gegenüber der Kerntransformation, wie z.B. die maternale Vererbung der Zellorganellen oder der hohe Ploidiegrad, sind auf die Mitochondrien übertragbar. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, das mitochondriale Genom höherer Pflanzen durch direkte Transformation zu verändern. Dies liegt vor allem daran, dass wenig Informationen bezüglich dieses genetischen Kompartiments vorlagen. In den letzten Jahren konnten einige Mitochondriengenome höherer Pflanzen sequenziert werden (siehe: <http://alice.bch.umontreal.ca/genera/chbase/gobase.html> und [http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/other/cp\\_list.html](http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/other/cp_list.html)). Dadurch wurden Untersuchungen zur Genregulation (z.B. Transkription und RNA-Prozessierung) möglich. Neben der Charakterisierung einer mitochondrialen RNA-Polymerase (Weihe et al., 1997; Hedtke et al., 1997), die im Pflanzenreich sehr verbreitet ist (Cermakian et al., 1996), war die Identifizierung von Promotoren (Shadel und Clayton, 1993; Binder und Brennicke, 1993a; Binder et al., 1995; Tracy und Stern, 1995) eine wichtige Grundlage für eine potentielle Mitochondrientransformation. Aber auch die Entdeckung des „RNA-editing“, das zu einer Veränderung der genetischen Information führen kann, spielt eine große Rolle. Man unterscheidet zwei Arten des „RNA-editings“. Beim Substitutionsediting werden die Basen bestimmter Nukleotide verändert oder ausgetauscht, ohne dass die Gesamtlänge des Transkriptes verändert wird, während es beim Insertions/Deletionsediting durch Entfernung bzw. Einfügen von Nukleotiden zu einer Verschiebung des Leserasters kommen kann. Leider sind die genauen Mechanismen des „editings“ bisher nicht aufgeklärt.

In dieser Arbeit werden zwei unterschiedliche Strategien zur stabilen Transformation von pflanzlichen Mitochondrien verfolgt (Abb.1.2). Zum einen wird ein mitochondrienspezifischer Ansatz gewählt, d.h. es werden Inhibitoren verwendet, die die Atmungskette der Mitochondrien hemmen und auf den restlichen Stoffwechsel der Zelle

keinen direkten Einfluss ausüben. Zum anderen werden in Anlehnung an die Plastidentransformation (siehe Kapitel 1.3), generelle Inhibitoren der Proteinbiosynthese verwendet, welche durch die Produkte der entsprechenden in die Mitochondrien eingebrachten Resistenzgene detoxifiziert werden sollen.

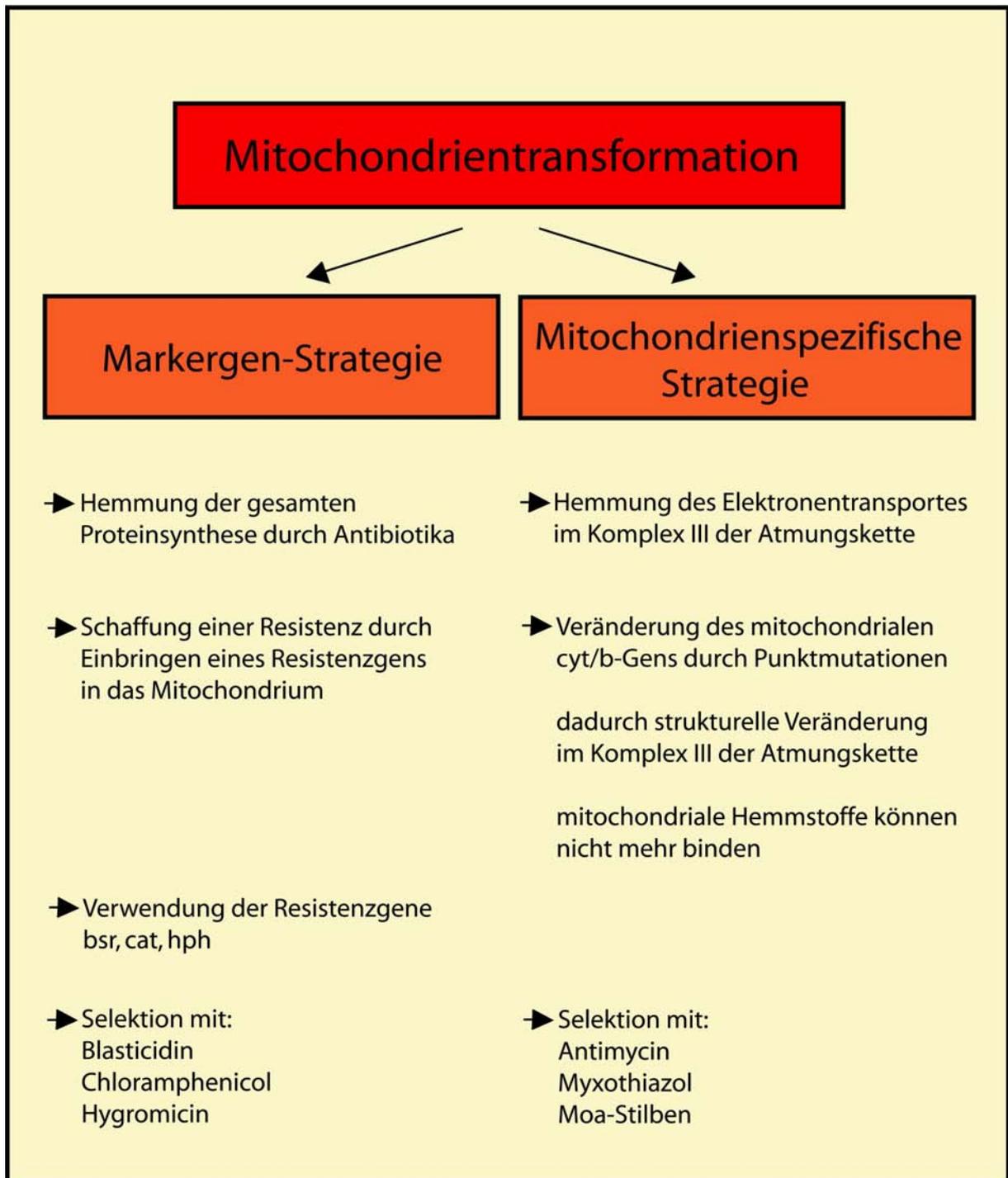


Abb. 1.2 Strategien zur Mitochondrientransformation

Das Kurieren einer mitochondrialen Defektmutante, wie es erfolgreich bei *Chlamydomonas reinhardtii* und *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden konnte, wäre sicherlich auch für höhere Pflanzen die eleganteste Strategie. Man könnte im Idealfall einen phänotypisch erkennbaren Defekt ohne Antibiotika als selektiven Hemmstoff kurieren. Leider gibt es mit Ausnahme der „nonchromosomal stripe mutants“ bei Mais (Gu et al, 1993; Marienfeld et al. 1993) und Mutanten bei der Blütenentwicklung von Tabak (Kofer et al. 1991) keine mitochondrialen Mutanten. Versuche, selbst Defektmutanten herzustellen, schlugen fehl, da die meisten mitochondrialen Mutationen letal sind.

Voraussetzung für beide Transformationsansätze ist daher neben geeigneten Hemmstoffen eine effiziente Transformationsmethode, ein gutes etabliertes Gewebekultursystem und die Auswahl der geeigneten Zielpflanzen. Als Transformationsmethoden wurden die biolistische Methode und die polyethylenglykolinduzierte Methode (PEG) verwendet. Mit der biolistischen Methode konnten schon Mitochondrien von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Saccharomyces cerevisiae* erfolgreich transformiert werden. Bei der Plastidentransformation konnten mit dieser Methode sehr hohe Transformationseffizienzen erzielt werden (Boynton et al., 1988). Mit der PEG-Methode werden seit der Veröffentlichung von Golds et al. (1993) routinemäßig Plastiden transformiert. Wichtige Kriterien für die Auswahl der Zielpflanzen waren einerseits die genauen Informationen der relevanten mtDNA-Bereiche und andererseits die Regenerationseigenschaften. Zu Beginn dieser Arbeit war nur das Mitochondriengenom von *Arabidopsis thaliana* (Unsold et al., 1997) sequenziert. Von anderen dicotylen Pflanzen waren aber zumindest einige Sequenzabschnitte bekannt. Beim Tabak waren unter anderem die Sequenz für das *cob*-Gen (Bohner und Chase, 1997) und eine 7 kB Sequenz, die im Zusammenhang mit der cytoplasmatischen männlichen Sterilität (*cms*) stehen könnte, bekannt (Gutierrez et al., 1997). Neben der genauen Kenntnis des mitochondrialen Genoms sind wie oben erwähnt die Eigenschaften der verwendeten Zielpflanzen bzw. des entsprechenden Pflanzengewebes entscheidende Faktoren. *Nicotiana tabacum* besitzt sehr gute Regenerationseigenschaften, sowohl aus Protoplasten als auch aus Blättern und Wurzeln. Für die Etablierung der Plastidentransformation war dies ein entscheidendes Kriterium. Das Regenerationsvermögen von *Arabidopsis thaliana* ist bei allen Gewebearten deutlich schlechter. Bisher war es nicht möglich, von *Arabidopsis* Plastomtransformanten zu bekommen, die sich normal entwickeln. Aus diesen Gründen wurde für die mitochondrialen Transformationen Tabak als Zielpflanze ausgewählt. Die Bestimmung des Zielgewebes richtet sich dabei nach den Selektionsbedingungen, der Anzahl der Mitochondrien pro Zelle und der Teilungsaktivität der Mitochondrien in den entsprechenden Gewebearten. In dieser

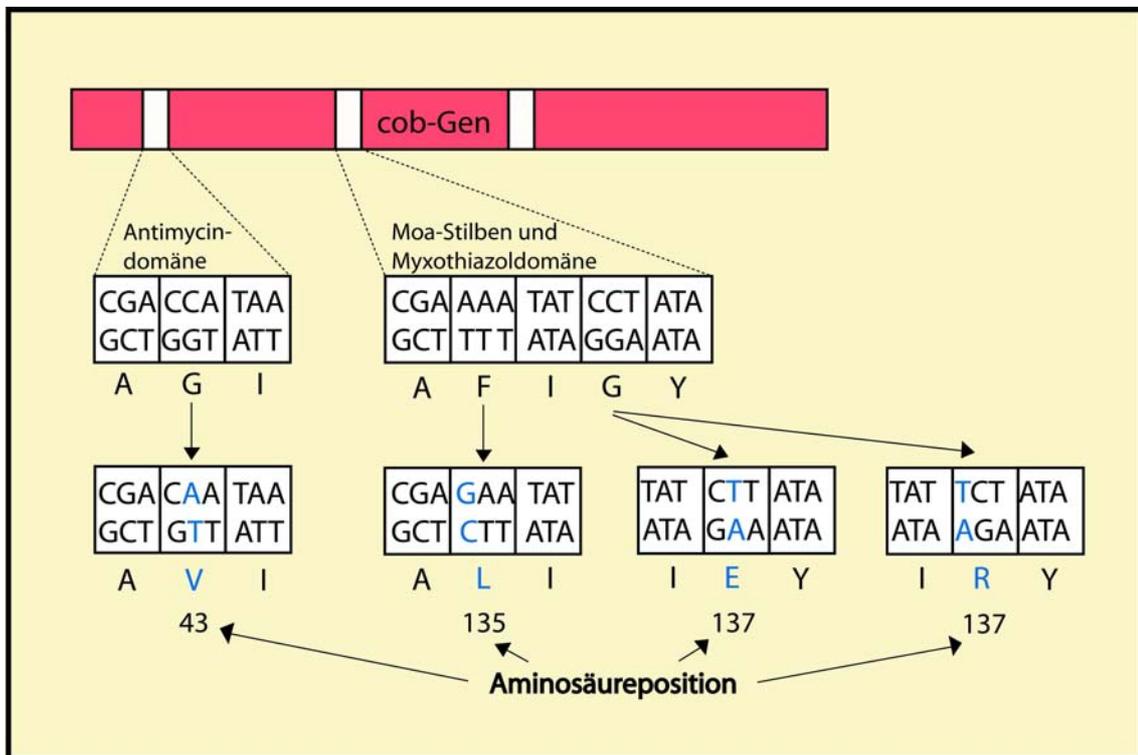
Arbeit werden die Selektionsbedingungen der verschiedenen Antibiotika bei Protoplasten, Mikrokolonien und Blattstücken getestet. Als alternative Zielgewebe wurden sowohl plastidäre Tabak-, 'knock-out'-Mutanten (*rpo*-Mutanten) verwendet, die keine plastidäre RNA-Polymerase synthetisieren können als auch Suspensionskulturen von *rpo*-Mutanten und Arabidopsis. *Rpo*-Mutanten sind photosynthetisch inaktiv. Die gesamte Energiebereitstellung muss von den Mitochondrien übernommen werden, was eine hohe Aktivität und vermutlich eine höhere Anzahl von Mitochondrien im Vergleich zum Tabak-Wildtyp voraussetzt. Möglicherweise sind dies geeignete Bedingungen für eine Mitochondrientransformation. Auch hohe Teilungsraten von Mitochondrien, wie sie in Suspensionskulturen vorkommen, könnten für die Rekombination eines in das Mitochondriengenom inserierten Transgens von Vorteil sein. Als Zielgewebe für die erfolgreichen Mitochondrientransformationen von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Saccharomyces cerevisiae* dienten ebenfalls Suspensionskulturen.

#### **1.4.1.1 Mitochondrienspezifischer Transformationsansatz**

Wie schon in Kapitel (1.2) beschrieben, eignen sich die Komplexe der Atmungskette bezüglich der Selektion von Mitochondrientransformanten und dabei insbesondere das *cob*-Gen als mögliche Angriffspunkte für eine Mitochondrientransformation. Aufgrund der beschriebenen starken Konservierung bestimmter resistenzverleihender Domänen gegenüber Antimycin, Myxothiazol und E- $\beta$ -Methoxyacrylat innerhalb des *cob*-Gens, wird in dieser Arbeit ein Teil des *cob*-Gens kloniert und spezifische resistenzverleihende Punktmutationen eingeführt. Durch Transformation soll ein Teil des nativen *cob*-Gens durch das veränderte Fragment ersetzt werden und zu einer entsprechenden Resistenz gegen bestimmte Antibiotika führen. Im Laufe der Selektion sollte das mutierte, neu eingebrachte *cob*-Gen durch Segregation homochondriomisch vorliegen. Ein Vorteil dieser Strategie ist, dass nur die Sequenz des nativen Gens bekannt sein muss. Regulatorische Elemente wie Promotor- und Terminator-Sequenzen werden nicht benötigt, da das mutierte Teilstück des Gens durch homologe Rekombination integriert werden sollte und die Regelemente des nativen Gens benutzt werden. Außer der eingeführten resistenzverleihenden Punktmutation wurden zwei weitere ‚neutrale‘ Punktmutationen eingeführt. Sie kreieren eine neue bzw. zerstören eine vorhandene Restriktionsschnittstelle und dienen dem Nachweis der mitochondrialen Integration.

Es wurden Transformationskassetten hergestellt, die in zwei unterschiedlichen Domänen des *cob*-Gens Punktmutationen besitzen und Resistenzen gegenüber den mitochondrialen Hemmstoffen Antimycin, Myxothiazol und E- $\beta$ -Methoxyacrylat (im folgenden als Moa-

Stilben bezeichnet) verleihen. Der Transformationsvektor, der die Antimycinresistenz bewirkt, besitzt an Position 128 des Tabak *cob*-Gens einen Basenaustausch von G→T. Dieser Basenaustausch bewirkt, dass anstelle der Aminosäure Glycin die Aminosäure Valin gebildet wird. Um Resistenzen gegenüber Myxothiazol und Moa-Stilbenen zu erreichen, wurden drei verschiedene Transformationskassetten hergestellt, die jeweils unterschiedliche Punktmutationen besitzen. Dabei führen die Basenaustausche an Position 403 von T→G zur Bildung der Aminosäure Leucin und an Position 409 von G→A zu einer Substitution der Aminosäure Glycin durch Glutaminsäure. Beide bewirken bei *Chlamydomonas reinhardtii* und *Saccharomyces cerevisiae* Resistenzen gegenüber Myxothiazol (Bennoun et al., 1991; di Rago et al., 1989). Ein Basenaustausch an Position 408 von G→A führt zu der Aminosäure Arginin und bewirkt eine Resistenz gegenüber Myxothiazol und Moa-Stilbenen. In Abb. 1.3 sind die eingeführten Mutation schematisch dargestellt.



**Abb. 1.3 Resistenzverleihende Mutationen innerhalb des *cob*-Gens.** Veränderte Basen und die daraus resultierenden Aminosäuremodifikationen sind blau markiert.

Das Cytochrom *b<sub>6</sub>*-Gen der Chloroplasten ist besonders im aminoterminalen Bereich in weiten Teilen identisch mit dem Cytochrom *b*-Gen der Mitochondrien. Aus diesem Grund besteht eine ähnliche Sensitivität gegenüber „mitochondrialen“ Hemmstoffen (Weber und Wolf, 1988). Bei Tabak und einigen anderen Pflanzenarten besteht eine natürliche Resistenz gegenüber verschiedenen Inhibitoren. Diese Resistenzen beruhen ebenfalls auf Punktmutationen und haben sich im Laufe der Evolution manifestiert. Das Cytochrom *b<sub>6</sub>* -

Gen der Tabakchloroplasten besitzt gegenüber den ausgewählten Antibiotika Antimycin, Myxothiazol und Moe-Stilben eine natürliche Resistenz.

#### 1.4.1.2 Generelle Hemmstoffe zur Mitochondrientransformation

Die Plastidentransformation wird bei Tabak seit 1993 routinemäßig eingesetzt (Svab und Maliga, 1993; Golds et al., 1993). Eine erfolgreiche Selektion mit Spectinomycin bzw. Streptomycin konnte durch die Integration des resistenzverleihenden Markergens *aadA* erzielt werden (Kapitel 1.3). Grundsätzlich sollte es auch bei Mitochondrientransformationen möglich sein, mit Hilfe eines resistenzverleihenden Markergens erfolgreich zu selektieren. Eine direkte Übertragung des plastidären Ansatzes ist aber nicht möglich, da durch „*in-organello*“-Versuche gezeigt werden konnte, dass keine hemmende Wirkung von Spectinomycin und Streptomycin auf die Proteinbiosynthese von Mitochondrien besteht (Diplomarbeit A. Bentele). Aus den zahlreichen Selektionsmarkern, die bei Kerntransformationen eingesetzt werden und durch ihre Wirkung auch für die Organellentransformation einsetzbar sein sollten, wurden folgende Resistenzgene ausgewählt:

- **Blasticidine-S-Deaminase (*bsr*-Gen)**
- **Chloramphenicolacetyltransferase (*cat*-Gen)**
- **Hygromycin-B-Phosphotransferase (*hph*-Gen)**

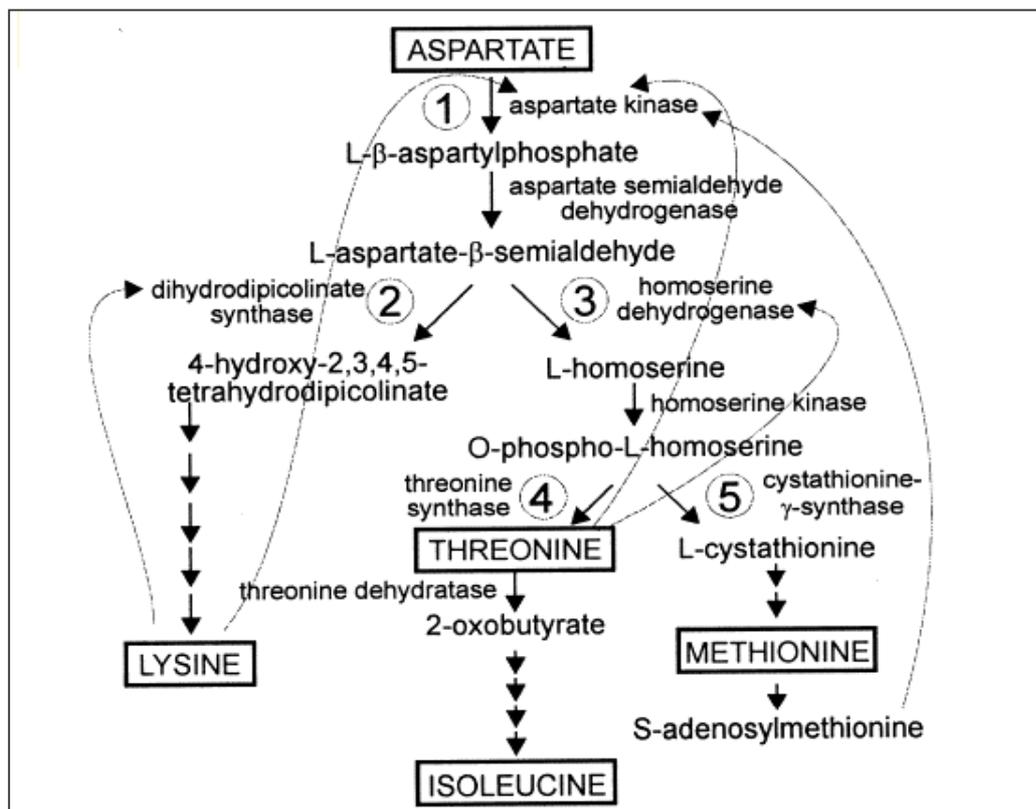
Die Wirkung der drei Antibiotika auf die Proteinsynthese ist dabei unterschiedlich. Blasticidin ist als Nucleosid-Antibiotikum ein Inhibitor der tRNA-Bildung, während Chloramphenicol die Elongation an den 50S- und 70S-Ribosomen hemmt. Hygromycin bindet an die 30S-Untereinheit und hemmt zusätzlich den Elongationsfaktor Tu sowie die GTP abhängige Translokation (Gräfe, 1992). Alle drei Antibiotika sollten damit auch die Proteinsynthese der Mitochondrien beeinflussen. Bei einer erfolgreichen Transformation der Mitochondrien müssten die Gene daher in der Lage sein, der Pflanzenzelle Resistenz zu verleihen.

Der Aufbau der Transformationskassetten ähnelt konzeptionell stark denen, die bei Plastidentransformationen eingesetzt werden. Aufgrund der fehlenden Charakterisierung homologer Regelelemente wurden heterologe Regelelemente benutzt. Der Promotor stammt aus dem *atpA*-Gen von *Oenothera lamarckiana* (Binder und Brennicke, 1993b), die Terminatorregion aus dem *atp9*-Gen von *Pisum sativum* (Morikami und Nakamura, 1987). Der Promotor wurde in heterologen Transkriptionsexperimenten erfolgreich auf seine Funktion getestet (S.Binder, Ulm). Als tabakhomologe flankierende Sequenz wurde ein 6 kB

großer Genabschnitt eingesetzt, welcher das offene Leseraster *orf87* und die Gene *nad3* und *rps12* beinhaltet (Gutierrez et al., 1997) (siehe Abb 4.1).

### 1.4.2 Plastidentransformation

Die Vorteile und das biotechnologische Potential der Transformation von Plastiden sind bereits in Kapitel 1.3 besprochen worden. In dieser Arbeit wird erstmals ein Gen, das für ein Enzym des Aspartat-Stoffwechsels kodiert, stabil in das plastidäre Genom integriert mit dem Ziel, die Lysinproduktion zu steigern. Die meisten am pflanzlichen Aspartat-Stoffwechsel beteiligten Enzyme werden vom Kern kodiert und in die Plastiden exportiert (Bryan, 1980; Jacobs et al., 1999). Aspartat ist das Ausgangsprodukt für die Aminosäuren Threonin, Methionin, Isoleucin und Lysin. Abb. 1.4 gibt einem Überblick über die Enzyme des pflanzlichen Aspartatstoffwechsels.



**Abb. 1.4 Der pflanzliche Aspartat-Stoffwechsel.**

Innerhalb des Aspartat-Stoffwechsels katalysiert die Dihydrodipicolinat-Synthase (DHDPS) den ersten Schritt der Lysinbiosynthese, der Kondensation von 3-Aspartat-Semialdehyd mit Aspartat zu 2,3-Dihydrodipicolinat. Es folgen weitere enzymatische Reaktionen, bis zum Endprodukt Lysin. Im Aspartat-Stoffwechsel gibt es mehrere regulatorische Mechanismen zur Steuerung der Aminosäureproduktion. Lysin hemmt ab einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  die DHDPS und bei höheren Konzentrationen zusätzlich die Aspartatkinase, beeinflusst jedoch

die Threonin-Synthase positiv. Die DHDPS der Bakterien ist dagegen nur bei sehr hohen Lysinkonzentrationen (bis zu 200-fach höher als bei Pflanzen) zu hemmen (Glassmann, 1992; Galili, 1995). Das *dhdps*-Gen konnte bei zahlreichen Bakterien und Pflanzenarten isoliert werden. Auffällig ist dabei die starke Homologie sowohl bei den Prokaryonten als auch im Pflanzenreich. So beträgt beispielsweise die DNA-Sequenzhomologie zwischen dem dikotylen Tabak und dem monocotylen Weizen über 73 % (Jacobs et al., 1999).

Zur Steigerung des Lysingehaltes in Pflanzen wurden Tabakprotoplasten mit UV-Licht bestrahlt, um Mutationen im *dhdps*-Gen zu erzeugen (Negrutiu et al., 1984). Selektiert wurden die Mutanten mit dem toxischen Lysinanaloga S-(2-Aminoethyl) L-Cystein (AEC). Die Möglichkeit einer Selektion mit AEC wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen an Mikroorganismen (Nakayama et al., 1966; Sano und Shiio, 1970; Brock et al., 1973; Demain, 1975) und später an verschiedenen pflanzlichen Suspensionskulturen (Negrutiu et al., 1978; Bright et al., 1979; Matthews et al., 1980) getestet. AEC wird als Lysinanaloga in Polypeptide eingebaut und führt ab einer bestimmten Konzentration zum Erliegen des Stoffwechsels und damit zum Absterben der Zelle. Bei Mutanten, die ein Vielfaches an Lysin produzieren können, wird im Verhältnis sehr viel weniger AEC in Polypeptide eingebaut, was sich als Selektionsvorteil nutzen lässt (siehe Abb.4.8).

Durch Selektion mit AEC wurde unter anderem eine Mutante (RAEC-1) selektiert, die eine um bis zu 20-fach erhöhte Lysinproduktion besitzt. Durch molekulare Analysen von RAEC-1 wurde eine zweifache Punktmutation (von AAC→ATT) an der Aminosäureposition 104 mit einer Aminosäuresubstitution von Asparagin durch Isoleucin identifiziert (Ghislain et al., 1995). Um zu testen, ob das mutierte Gen (*dhdps-r1*) in einem heterologen Umfeld ebenfalls zu einer Insensitivität gegenüber Lysin führt oder ob weitere regulatorische Faktoren eine Rolle spielen, wurde das *dhdps-r1*-Gen in Lysin-sensitive *Escherichia coli*-Stämme transformiert. Die analysierten *Escherichia coli*-Klone zeigten eine Expression des mutierten DHDPS-Proteins und waren insensitiv gegenüber Lysin. Bei Mais-, Arabidopsis- und Pappelmutanten konnten vergleichbare Punktmutationen im *dhdps*-Gen charakterisiert werden, die zu einer erhöhten Lysinproduktion führten (Shaver et al., 1996; Sarrobert et al., 2000). Bei Mutanten anderer Pflanzenarten, wie z.B. Gerste, Möhre, Weizen und Reis, wurde zwar eine erhöhte Insensitivität gegenüber Lysin festgestellt, Punktmutationen im *dhdps*-Gen konnten jedoch nicht charakterisiert werden (Bright et al., 1979; Matthews, 1980; Yamada und Hashimoto, 1986; Miao et al., 1988).

Im Rahmen dieser Arbeit soll das *dhdps-r1*-Gen in die Plastiden von Tabak und Kartoffel integriert werden, um eine Erhöhung der Lysinproduktion zu erreichen. Ferner soll die Frage

geklärt werden, ob AEC als selektiver Hemmstoff zur Plastidentransformation genutzt werden kann. Die Transformationskassette enthält homologe plastidäre Regelelemente, das *aadA*-Gen als zusätzlichen bereits erprobten Selektionsmarker und flankierende homologen Sequenzen. Der Integrationsort wurde so ausgewählt, dass der Vektor auch zur Plastomtransformation der Kartoffel als heimischer Nutzpflanze genutzt werden kann. Das Kerngenom von Kartoffeln konnte bereits mit dem *dhdps-r1*-Gen aus Tabak transformiert werden. Es wurden dabei um bis zu 70 % erhöhte DHDPS-Proteinkonzentrationen gegenüber dem Wildtyp erzielt (Ñopo et al., 2001). Die Plastomtransformanten von Tabak und Kartoffel sollen einerseits auf Spectinomycin, andererseits auf AEC selektiert werden. Die Selektion von Kerntransformanten auf AEC konnte bei Tabak (Frankard et al., 1992; Perl et al., 1993; Ghislain et al., 1995) und Kartoffel (Ñopo et al., 2001) erfolgreich demonstriert werden. Bei korrekter Integration und Funktion des eingebrachten Gens in die Plastiden sollte eine erfolgreiche Selektion möglich sein.

Eines der größten Probleme bei der stabilen Plastidentransformation ist das Fehlen von universell nutzbaren Selektionsmarkern. Im pflanzlichen Bereich ist die routinemäßige Selektion mit dem *aadA*-Gen auf die Modellpflanze Tabak beschränkt. Bei anderen Pflanzenarten ist die toxische Wirkung von Spectinomycin bzw. Streptomycin problematisch. Auf Spectinomycin bzw. Streptomycin selektierte Arabidopsis- und Tomatenpflanzen sind in ihrem Wachstum sehr stark eingeschränkt und oft steril (Khan und Maliga 1999; Ruf et al. 2001). Eine Selektion mit Kanamycin (*nptII*-Gen) war lange Zeit für Plastidentransformanten sehr ineffizient (Carrer et al., 1993). Huang et al. (2002) konnten jedoch mit dem *aphA-6*-Gen aus *Acinetobacter baumannii* ein zweites effektives Selektionssystem mit Kanamycin als Selektionsmarker etablieren. Daniell et al. (2001) beschreibt die Selektion plastidärer Tabaktransformanten mit Betain-Aldehyd, der Vorstufe des effizienten Osmoseregulators Glycinbetain. Salztolerante Pflanzen produzieren als Antwort auf Trocken- bzw. Salzstress den Osmoseregulator Glycinbetain, um sich den Umweltbedingungen anzupassen. Die Betain-Aldehyd-Dehydrogenase (BADH) katalysiert dabei die Reaktion vom toxischen Betain-Aldehyd zum Osmoseregulator Glycinbetain. Salzeempfindlichen Pflanzen fehlt dieser Stoffwechselweg. Durch Plastidentransformation mit dem Gen, welches für die BADH kodiert, sollen salzeempfindliche Pflanzen, mit dem toxischen Betain-Aldehyd selektiert werden können. Mit dieser Methode wäre es jedoch nicht möglich, „salztolerante“ Pflanzen wie Spinat, Gerste oder Zuckerrübe zu transformieren. Allerdings gibt es keine weiteren Hinweise in der Literatur, die eine Anwendbarkeit dieses Selektionssystems bestätigen.

AEC als plastidärer Selektionsmarker sollte prinzipiell universell einsetzbar sein. Alle Pflanzen verfügen über das DHDPS-Enzym und die Endprodukthemmung dieses Enzyms durch Lysin. Neben einer Erhöhung des Lysingehaltes in den Transformanten ist bei einer Nutzung des *dhdps-r1*-Gens als Markergen eine antibiotikumfreie Selektion möglich. Die Verbreitung von Antibiotikumgenen durch vertikalen oder horizontalen Gentransfer ist damit ausgeschlossen. Das zeit- und arbeitsaufwändige Entfernen eines Resistenz-Markergens, beispielsweise durch ein *CRE-lox*-spezifisches Rekombinationssystem (Kapitel 1.3), ist hier nicht notwendig. Mit einem solchen universell einsetzbaren Selektionssystem wäre die Möglichkeit gegeben, bei agronomisch relevanten Nutzpflanzen gezielte Plastidentransformationen durchzuführen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Biochemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial

Alle hier nicht explizit aufgeführten Standardchemikalien (anorganische Salze, Säuren, übliche organische Verbindungen, Lösungsmittel) wurden im Reinheitsgrad „pro analysi“ von folgenden Herstellern bezogen: Baker Chemicals, Philipsburg (USA), Merck, Darmstadt, Roth, Karlsruhe, Sigma-Aldrich, Deisenhofen. Im Folgenden sind spezielle Substanzen aufgeführt, die ebenfalls im Reinheitsgrad „pro analysi“ für Zellkultur und Molekularbiologie eingesetzt wurden:

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>
$\alpha$ - <sup>32</sup> P-dATP	Amersham Buchler, Braunschweig
Agar „purified“ A-7921	Amersham Buchler, Braunschweig
Agarose Nu Sieve	Biometra, Göttingen
Agarose SeaKem	Biozym, Hameln
Alginat (aus <i>Macrocystis pyrifera</i> )	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin	Serva Fernbiochemica, Heidelberg
Antimycin A (Gemisch aus A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> , A <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bacto Agar	ICN Biomedicals, Eschwege
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, MI (USA)
Blasticidin S	Calbiochem
BSA	MWG Biotech, Ebersberg
B5-Salze (Gamborg's)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Caseinhydrolysat	ICN Biomedicals, Eschwege
Chloramphenicol	Serva Fernbiochemica, Heidelberg
Diamin C	Bayer, Leverkusen
dNTPs	Amersham Buchler, Braunschweig
E- $\beta$ -Methoxyacrylat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerin 99,5%, wasserfrei	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Difco, Detroit, MI (USA)
Hygromycin B	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
$\beta$ -Indolylessigsäure (IAA)	Merck, Darmstadt
Kinetin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ladepuffer 6x	MBI Fermentas, Vilnius (Litauen)
Mannit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Moa-Stilbene	BASF, Ludwigshafen
Myo-Inosit	Boehringer, Heidelberg
Myxothiazol	Sigma-Aldrich, Steinheim
MS Basalsalz-Mischung (M-5524)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NAA (Naphthalene acetic acid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
N-Lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nylonmembran	Amersham Buchler, Braunschweig
PEG <sub>1500</sub>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polypuffer 74	Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
SAP (shrimp alkaline phosphatase)	Amersham Buchler, Braunschweig
Spectinomycin (als Spectinomycindihydrochlorid)	Sigma, St. Louis, USA
Spermidin, freie Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
X-Gluc (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid)	Sigma, St. Louis, USA

### **Molekularbiologische „kits“**

DNeasy plant mini kit	Qiagen, Hilden
DNeasy plant maxi kit	Qiagen, Hilden
Extensor Long PCR System	Advanced Biotechnologie, Hamburg
High pure PCR-Produkt purification kit	Roche, Mannheim
Klenow Labelling Kit	MBI Fermentas
MicroSpin Columns S-200 HR	Pharmacia, Uppsala (S)
QIAEX kit for DNA extraction from agarose gels	Qiagen, Hilden
QIAGEN mini/midi/maxi kit for plasmid purification	Qiagen, Hilden
QiagenQIAprep spin kit for plasmid purification	Qiagen, Hilden
QIAprep spin kit for plasmid minipreps	Qiagen, Hilden
Rapid DNA ligation kit	Boehringer, Mannheim
Rapid-Hyb-Buffer System	Amersham Pharmacia Biotech
RNeasy plant mini kit	Qiagen, Hilden

### **Enzyme**

Advantage 2 DNA-Polymerase-Mix	Clontech Laboratories, (USA)
AgeI	Promega, Mannheim
<i>Bam</i> H I	USB
<i>Apa</i> I, <i>Bsp</i> 120 I, <i>Bst</i> 1107 I, <i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RV, <i>Eco</i> 105 I, <i>Cla</i> I, <i>Hind</i> III, <i>Nco</i> I, <i>Not</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Xba</i> I,	MBI Fermentas
<i>Dpn</i> I	Gibco BRL, Eggenstein (D)

Cellulase: „Onozuka“ R-10	Yakult Pharmaceutical Industry, Japan
Extensor Long PCR System	Advanced Biotechnologie, Hamburg
Hotstart- <i>Taq</i> - DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Klenow Enzym	Boehringer, Mannheim
<i>Klentaq</i> -DNA-Polymerase	Clontech Laboratories, Heidelberg
Mazerase: „Macerozyme“ R-10	Yakult Pharmaceutical Industry, Japan
Proteinase K	Amersham Buchler, Braunschweig
RNase A	Boehringer Mannheim
<i>Taq</i> - DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
<i>Taq</i> - DNA Polymerase	MBI Fermentas, Vilnius (Lit)
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, Vilnius (Lit)

### **DNA-und RNA Standards**

DNA Quantitation Standards QSK-101 (200 bp, 500 bp, 1000 bp), jeweils 100 ng/μl	GenSura Laboratories, CA (USA)
Längenstandard III, V und VII	Boehringer, Mannheim
Gene-Ruler™ 1 kb, DNA Ladder	MBI Fermentas, Vilnius (Lit)
λ DNA / <i>Eco</i> 130 I / <i>Mlu</i> I – DNA Size Marker (421 bp - 26282 bp)	MBI Fermentas, Vilnius (Lit)
100 bp DNA Ladder (0,05 mg/ml)	MBI Fermentas, Vilnius (Lit)
λ <i>Eco</i> 57I / <i>Mlu</i> I	MBI Fermentas, Vilnius (Lit)
RNA Millenium Marker	Ambion, Austin, USA
RNA-Marker Längenstandard (9488 nt- 363 nt)	USB, Cleveland (USA)

### **Laborgeräte**

ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer	PE Biosystems, Foster City, (USA)
Absaugpumpe VacuGene Pump	Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Aminosäureanalyser Biotronik LC 5001	Biometra, Göttingen
Analysenwaage Analytic AC 120 S	Sartorius, Göttingen
Autoklav Aesculap 420	Aesculap-Werke, Tuttlingen
Autoklav Varioklav 500 EV	H + P Labortechnik, München
BIORAD <i>E.coli</i> Pulser	Bio-Rad, Hercules, CA (USA)
Elektrophorese-Spannungsversorgung 2301	Bio-Rad, Hercules, CA (USA)
Makrodrive	LKB, Produkter, Bromma (S)
Elektrophorese-Spannungsversorgung	Gibco BRL, Eggenstein
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Zefa-Laborservice, München
Geldokumentations-System	MWG-Biotech, Ebersberg

Gelelektrophoresekammer Easy-Cast B3	Owl Scientific, Woburn, MA (USA)
Gelelektrophoresekammer GNA 200	Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Gelelektrophorese-Photosystem QS	Kodak IBI, New Haven, CT (USA)
Inverses Mikroskop IM-35 und Invertoskop ID 03	Zeiss, Oberkochen
Klimaschrank Rumed Nr. 1200	Rubarth Apparate, Hannover
Mikroliter-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroliter-Pipetten	Gilson, Villiers Le Bel (F)
Mikrowellenofen MG 810	Bosch, Stuttgart
Osmometer Osmomat O30	Gontec, Berlin
Osram L85 W/25 Fluoreszenzlampen (weiß)	Osram, München
Particle gun PDS 1000/He	Bio-Rad, Hercules, CA (USA)
PCR Express Thermal Cycler	Hybaid, Ashford (UK)
pH-Meter Meßgerät WTW pH522	WTW, Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim
Pipetboy acu	Integra Biosciences: Tecnomara, Wallisellen (CH)
Phosphoimager BAS 1500	Fujifilm, Düsseldorf
Reinstwassersystem Nanopure II mit Vorschaltensalzer behropur	Barnstead Sybron, Bremen Behr Labortechnik, Düsseldorf
Robocycler 96	Stratagene, La Jolla, CA (USA)
Schüttelmaschine Type AG 20	Infors AG, Bottmingen
Schüttelmaschine Labshaker Modell Kühn	B. Braun Biotech International
Sicherheits-Sterilbank UVF6.12 S	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Stereomikroskop STEMI SV 8	Zeiss, Oberkochen
Sterilbank Microflow	Stalco, Düsseldorf
Thermoblock 5320	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Rundschüttelmaschine	Infors HT, München
UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Heidelberg
Vakuumpumpe MZ 8	Vacubrand, (USA)
„Vortex“ Genie 2 Modell 6560E	Scientific Indus., Bohemia, NY (USA)
Waage Typ 2255	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Wagner + Munz, München
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sorvall RC-5B, Rotor SS34, GSA	DuPont Instruments, Bad Homburg
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Universal II	Hettich, Tuttlingen (D)

Zentrifuge Z323K

Hermle Labortechnik, Wehingen

### **Verbrauchsmaterial**

Alufolie

Roth, Karlsruhe

Bakterienpetrischalen, steril (Ø 9 cm)

Greiner, Solingen

Elektroporationsküvetten 2 mm

Biotechnologie GmbH

Erlenmeyerkolben 50, 100, 500, 1000 ml

Schott, Mainz

Filtertips 0,1-1000 µl

Schultheis, München

Gewebekultur-Petrischalen, steril (Ø 6 cm)

Sarstedt, Nümbrecht

Gewebekultur-Petrischalen, steril (Ø 9 cm)

Renner, Dannstadt

Gewebekultur-Röhrchen, steril, 12 ml,

Greiner, Solingen

Kodak BioMax MR Film

Eastman Kodak Company

Kunststoffküvetten Nr. 67742

Sarstedt, Nümbrecht

Kunststoffnetz Scrynel PP2000

K. H. Büttner GmbH, Wasserburg

Nescofilm, 10 cm × 40 m

Bando Chemical Ind., Kobe (Japan)

Polypropylen-Kulturröhrchen 2059

Falcon, Lincoln Park, NJ (USA)

Polypropylen-Röhrchen 15 ml/50 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Reaktionsgefäße „Eppis“ (0,5/1,0/1,5/2,0 ml)

Eppendorf, Hamburg

Schraubdeckel-Reaktionsgefäß

Sigma, St. Louis (USA)

Sieb 100 µm/1mm

Merck, Darmstadt

Sterilfilter AcroDisc 32 Supor 0,2 µm

Gelman Sciences, Ann Arbor (USA)

Stopfen für Erlenmeyerkolben 22 mm x 18 mm

Roth, Karlsruhe

48-well tissue culture clusters (Ø 1 cm)

Costar, Cambridge, MA (USA)

### **Software/Computer**

Digitale Camera, ActionCam

Agfa, München (D)

Geldokumentation: OneDScan

MWG-Biotech, Ebersberg

Phosphoimager-Auswertung: Tina 2.0

Raytest

Schreib- und Rechenprogramme, Office 97

Microsoft, Redmont (USA)

für Intel-PC

InforMax, Gaithersburg, MD (USA)

Vektor NTI Viewer 6.0/Vektor NTI 6.0

Bildverarbeitung Adobe Photoshop 5.0

Adobe, Mountain View (USA)

für Mac/Intel-PC

BLAST2 (NCBI)

Sequenzvergleiche:

Fasta (NCBI)

Sequenzdatenbank:

Pubmed, Medline (NCBI)

Literaturdatenbanken:

## 2.2 Pflanzenmaterial

Für die Mitochondrientransformation:

*Nicotiana tabacum* L. var. petit havanna (im folgendem als „Tabak“ bezeichnet)

*Arabidopsis thaliana* (im folgendem als „Arabidopsis“ bezeichnet)

*Nicotiana tabacum* L. var. petit havanna mit Deletionen in den Genen *rpo A*; *B* und *C1*, die für drei Unterheiten der plastidären RNA-Polymerase kodieren, wird in dieser Arbeit vereinfachend als „rpo-Tabak“ oder „rpo-Mutante“ bezeichnet.

Für die Plastidentransformation:

*Nicotiana tabacum* L. var. petit havanna

*Solanum tuberosum* L. var. Walli (im folgenden als „Kartoffel“ bezeichnet)

## 2.3 Bakterien und Vektoren

Bakterien für die Klonierung:

„Epicurian *coli* sure 2“ (Stratagene, Heidelberg)

*E. coli* DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983)

DNA-Vektoren:

pUC19 Yanisch-Perron et al. (1985)

pBS II KS - Stratagene (Heidelberg)

### Ursprungsplasmide

pBM*bsr* I (*bsr*-Gen) Rita Dorsch LMU München, Ralph Bock  
Universität Freiburg

Der pBS II KS-Vektor pBM*bsr* I enthält das *bsr*-Gen aus *Bacillus cereus* (Endo et al. 1988), zur Verfügung gestellt von B. Wetterauer, LMU München. Der mitochondriale *atpA* Promotor inklusive Ribosomenbindestelle stammt aus *Oenothera berteriana* (Binder und Brennicke, 1993, Universität Ulm). Der mitochondriale Terminator *atp9* ist aus *Pisum sativum* (Morikami und Nakumura, 1987). Die flankierenden homologen Sequenzen sind aus dem Chondriom von *Nicotiana sylvestris* und beinhalten *orf87*, *nad3*, *rps12* (Gutierrez et al. 1997).

pBM*cat* I (*cat*-Gen)

Rita Dorsch LMU München, Ralph Bock  
Universität Freiburg

ist identisch zum pBM*bsr* I-Vektor, enthält aber anstelle des *bsr*-Gens das *cat*-Gen aus *E. coli* (Alton und Vapnek, 1979), bereitgestellt von Axel Brennicke, Universität Ulm

pBM*hph* II (*hph*-Gen)

Rita Dorsch LMU München, Ralph Bock  
Universität Freiburg

ist identisch zum pBM*bsr* I-Vektor, enthält aber anstelle des *bsr*-Gens das *hph*-Gen aus *E. coli* (Gritz und Davies, 1983), bereitgestellt von Klaus Steinmüller, Universität Düsseldorf

pUM*anti* I

Sebastian Klaus, LMU München

enthält ein mutiertes Fragmentstück des mitochondrialen *cob*-Gens aus *Nicotiana tabacum*, kloniert in pUC 19.

pUC 19-*dhdpsr1*EcoRI

Marc Ghislain, Kartoffelforschungs-  
zentrum, Lima, Peru

enthält in einem EcoRI Fragment das mutierte *dhdps*-Gen aus *Nicotiana tabacum* (Ghislain, et al. 1995).

## pKCZ

Zhourong Zou, LMU München

Universaler Vektor zur Plastidentransformation von *Nicotiana tabacum*. Enthält das *aadA*-Gen aus *E. coli* (Goldschmitt-Clermont, 1991) unter Kontrolle eines 95 Bp Tabak-Promotorfragmentes des 16S rRNA-Operons („16S-Promotor“, auch als Prn bezeichnet). Als 5'-Bereich dient ein synthetisches 26 Bp Fragment, dessen Sequenz aus der 5'-Region des (monocistronischen) *rbcL*-Operons von Tabak abgeleitet ist. Der 3'-Bereich stammt zum einen aus dem *Chlamydomonas rbcL*-Operon (496 Bp) bzw. aus dem *rbcL*-Gen von *Nicotiana tabacum* (166 Bp). Die homologen Flanken sind aus *Nicotiana tabacum* und liegen zwischen den Genen *rpl32* und *trn* des Plastidengenoms.

## pUC16S5'psbA(orig)uidA3'rbcL

Zhourong Zou, LMU München

Vektor zur Zwischenklonierung. Enthält das *uidA*-Gen aus *E. coli* (Jefferson et al., 1986, 1987), mit einem modifizierten Startkodon, das eine *NcoI* Restriktionsschnittstelle enthält, den 16S-Promotor, das *rbcL*-Operon (166 Bp) aus *Nicotiana tabacum* und eine *psbA*5'UTR (Position 1595-1680 des Plastidengenoms von *Nicotiana tabacum*).

pUC19-35S-GUS

Arthur Pfitzner, LMU München

ist ein Klonierungsvektor des Typs pUC19 mit dem Insert 35S/gusA/3'NOS (35S-Promotor aus CaMV (Blumenkohl-Mosaikvirus); GUS-Strukturgen aus *E. coli*; Nopalin-Synthase-Terminations-/Polyadenylierungs-Signal aus *Agrobacterium tumefaciens*).

## 2.4 Methoden zur Herstellung rekombinanter DNA-Klone

### 2.4.1 Allgemeine Methoden

Die DNA-Klonierungsarbeiten wie PCR, Restriktion, Agarose-Gelelektrophorese, Dephosphorylierung, Erzeugung von „blunt ends“, Ligation und Bakterientransformation wurden mit Ausnahme der nachfolgend aufgeführten Methoden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.* 1989) oder nach Angaben der Enzymhersteller durchgeführt.

### 2.4.2 Isolierung von Plasmid- DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen (bis ca. 5 µg) zur Analyse rekombinanter Bakterienklone wurde ein Verfahren entwickelt, das sich an den „Miniprep durch alkalische Lyse“ (Birnboim and Doly, 1979) anlehnt, aber mittlerweile erheblich vereinfacht wurde: 1,5 ml LB-Bakterienkulturmedium mit 75 µg/ml Ampicillin wurden in 2 ml Eppendorfröhrchen abgefüllt und mit einer Pipettenspitze Bakterien angeimpft. Die Bakterien wurden über Nacht im Schüttler (220 rpm) bei 37°C inkubiert und durch Zentrifugation im gleichen Gefäß sedimentiert (Tischzentrifuge, 3 min., 15.000 rpm). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 350 µl TENS-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 150 µl 3 M Kalium-Acetat und kräftigem Mischen auf dem „Vortex-Gerät“ wurde 3 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. 400 µl des Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1.000 µl Ethanol (2,5-faches Volumen) ausgefällt. Das nach der Zentrifugation entstandene DNA-Pellet wurde einmal in 70% Ethanol (200 µl) gewaschen und dann in TE (pH 8,0) oder H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> aufgenommen. Es wurden 10 µg/ml RNase A zugegeben, um vorhandene RNA abzubauen. Zum besseren Lösen der DNA wurde 15-30 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C oder im Gefrierschrank bei -20°C. Die so erhaltene DNA konnte mit allen verwendeten Restriktionsenzymen problemlos geschnitten werden und war auch als Matrize für die PCR geeignet. Plasmid-DNA, die für Klonierungen und Sequenzierungen verwendet werden sollte, wurde mit dem „QIAprep spin-Kit“ aus 3 ml Bakterienkulturen nach dem Herstellerprotokoll isoliert.

**TENS –Puffer**

EDTA.....	1 mM
NaOH.....	0,1 M
SDS .....	0,5% w/v
Tris (pH 7,5) .....	10 mM

autoklavieren

Plasmid-DNA in größeren Mengen (für Ausbeuten von mehreren 100 µg) für die Mitochondrien- und Plastidentransformation wurde mit Qiagen-Midi- und Maxiprep-Säulen (Tip-100 bzw. Tip-500) isoliert. Nach der im Protokoll angegebenen Isopropanolfällung wurde die DNA in Wasser aufgenommen und nochmals mit 2,5 Volumen 100%-igem Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat gefällt. Erst dann wurde sie in TE pH 5,6 in einer Konzentration von mindestens 2 µg/µl aufgenommen und bei –20°C gelagert.

**2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur PCR-Klonierung des mitochondrialen *cob*-Gen-Fragments musste mit relativ kleinen DNA-Fragmenten von 130 bp bis 600 bp gearbeitet werden. Für die Gelelektrophorese wurden NuSieve und SeaKem Agarose in einer Konzentration bis zu 2,5% eingesetzt. Sowohl für den Lauf- als auch für den Gelpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet (Sambrook *et al.*, 1989).

**2.4.4 Ligation****A) „Sticky end“-Ligation**

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit „sticky ends“ wurden 20-100 ng Vektor-DNA mit einem etwa dreifachen molaren Überschuss an zu inserierenden Fragmenten gemischt und unter Verwendung des „Boehringer rapid ligation kits“ für 5-30 min bei RT inkubiert.

**B) „Blunt end“-Ligation**

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit „blunt ends“ wurden ca. 100 ng Vektor-DNA mit einem etwa zweifachen molaren Überschuss an zu inserierenden Fragmenten gemischt und unter Verwendung des „Boehringer rapid ligation kits“ für 30 min bei 20°C inkubiert.

### 2.4.5 Transformation von *E. coli*-Bakterien

Ligationsansätze von DNA-Fragmenten mit „sticky ends“ (*cob*-Gen-Fragment) wurden in kompetente Zellen (*E. coli* D5 $\alpha$ ) transformiert, die nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode hergestellt worden waren. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden etwa 5  $\mu$ l aus der Ligationsreaktion (20  $\mu$ l) zu 30  $\mu$ l kompetenten Bakterienzellen gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Mischung 45 s bei 42°C inkubiert und dann wieder 2 min auf Eis gegeben. Nach Zugabe von 150  $\mu$ l LB-Medium (vorgewärmt auf 42°C) wurde 1 h bei 37°C auf dem Schüttler (~200 rpm) inkubiert. Danach wurden die Zellen auf LB<sub>amp</sub>-Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Für „blunt ends“-Klonierungen dagegen wurden „Epicurian *coli* shure2“ Zellen der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden etwa 20 ng DNA aus der Ligationsreaktion zu 50  $\mu$ l kompetenten Bakterien gegeben. Sowohl die „blunt end“-Klonierungen als auch die Religationsansätze nach den inversen PCR's wurden mittels Elektroporation in *E. coli* transformiert. 2  $\mu$ l des gefällten und in TE-Puffer aufgenommenen Ligationsansatzes wurden mit 50  $\mu$ l „Epicurian Coli SURE“-Zellen 2 min auf Eis inkubiert und dann 4,8 ms im Elektroporator einer Spannung von 2,5 kV ausgesetzt. Direkt im Anschluß wurde 1 ml SOC-Medium (vorgewärmt auf 37°C) zugegeben und der Ansatz 1 h auf dem Schüttler (~200 rpm) bei 37°C geschüttelt, bevor die Zellen auf LB<sub>amp</sub> ausplattiert und über Nacht im 37°C-Brutschrank inkubiert wurden.

#### **SOC-Medium:**

Bacto Trypton .....	20 g/l
Bacto Hefe-Extrakt .....	5 g/l
NaCl.....	0,5 g/l
250 mM KCl.....	10 ml
pH 7,5; autoklaviert	

### 2.4.6 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Integration des *cob*-Gen-Fragments und des *dhdpsr1*-Gens in die Transformationsvektoren sowie zur Modifikation von pBM $hph$ II, wurden PCR-Klonierungen durchgeführt. Als Matrizen für die PCR wurde für das *cob*-Gen-Fragment Gesamt-DNA von Tabak benutzt, für das mutierte *dhdps*-Gen stand ein Vektor zur Verfügung (pUC 19-*dhdpsr1*EcoRI), welcher das *dhdpsr1*-Gen enthielt. Der Transformationsvektor pBM $hph$ II wurde als Matrize für die Herstellung der Transformationsvektoren pBM $hph$ III und pBM $hph$ IV verwendet. Die unter Verwendung der *Klentaq*- bzw. *Avantage2*-Polymerase amplifizierten DNA-Fragmente wurden nach einem Restriktionsverdau teils direkt, teils nach einer Elution aus einem

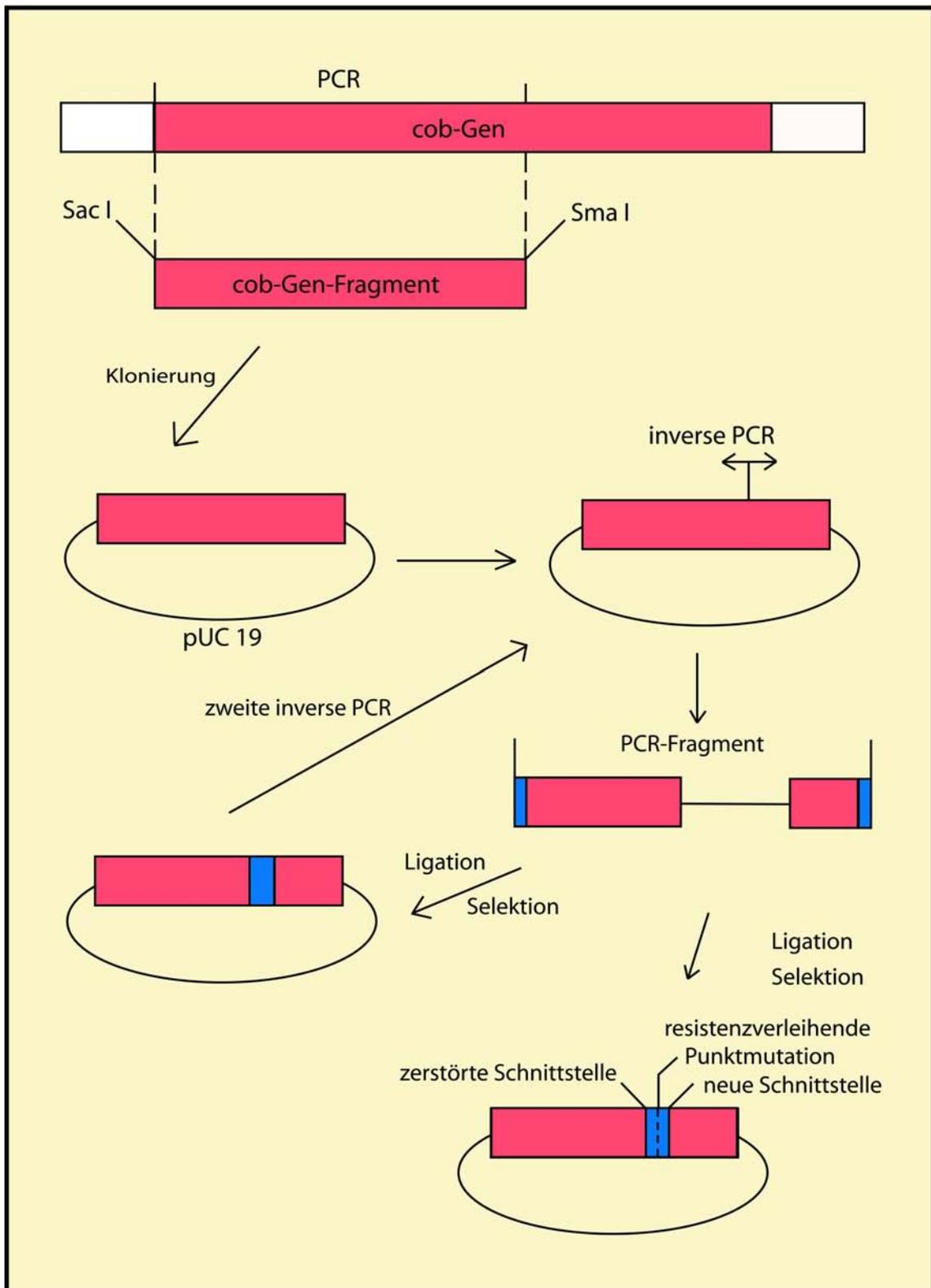
NuSieve Agarosegel in die Ligationreaktion mit dem Transformationsvektor oder einem für Herstellung der Transformationskassette benötigten Zwischenkonstrukt eingesetzt. Die Identität der klonierten Fragmente wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. In Tab. 2.1 sind die zur Klonierung eingesetzten Primer aufgelistet.

**Tab. 2.1 Oligonukleotide zur Klonierung von PCR-Fragmenten**

Gen-Fragmente	Primer for / rev	Restriktions- schnittstellen
<i>cob</i> -Gen-Fragment	for: 5' ATGAGCTCATGACTATAAGGAACCAA 3' rev: 5' ATCCCGGGAGTAAATAATGAAGACTA 3'	SacI SmaI
<i>dhdpsr1</i> -Gen	for: 5' CTCCCATGGATGACATAAAAGCACTTCGAT 3' rev: 5' CTCGAGCTCCTAATACCGACCCACCAAAT 3'	NcoI SacI
pBM <i>hph</i> -III	for: 5' GGATAGGTACGAAGTCACTC 3' rev: 5' CCACCTTCACCTTATTCTGC 3'	
pBM <i>hph</i> -IV	for: 5' TCGGATCCCGTACAAATGCTCGTAGCG 3' rev: 5' ATGGGCCCTTAGCCTCCGGCTTGGGC 3'	BamHI ApaI/Bsp120I

#### 2.4.7 Herstellung von Transformationsvektoren durch inverse PCR

Nach der Klonierung des *cob*-Gen-Fragments aus Tabak in einen pUC19-Transformationsvektor wurden spezifische Punktmutationen mit Hilfe der inversen PCR in das *cob*-Gen-Fragment eingebracht. Es wurden insgesamt drei verschiedene Transformationskassetten hergestellt, die Resistenzen gegenüber den mitochondrialen Hemmstoffen Myxothiazol und Moa-Stilbene vermitteln sollen. Der Transformationsvektor pUM*anti* I, der gegenüber dem mitochondrialen Inhibitor Antimycin A eine Resistenz verleihen soll, wurde für weitere Klonierungsschritte von S. Klaus zur Verfügung gestellt. Die Klonierungsstrategie wird in Abb. 2.1 dargestellt.



**Abb. 2.1 Klonierungsstrategie mitochondrienspezifischer Transformationskassetten.**

Für jede Transformationskassette wurden die Primer so ausgewählt, das sie jeweils an zwei Stellen einen Basenaustausch im Vergleich zum *cob-Gen*-Wildtypfragment besitzen. Der eine Basenaustausch bewirkt eine Resistenz der transformierten Pflanze gegenüber dem mitochondrialen Hemmstoff, der andere „neutrale“ Basenaustausch generiert eine neue

Restriktionsschnittstelle, um mitochondriale Transformanten von spontanen Mutanten zu unterscheiden. Die 5'-Enden der beiden Primer grenzen aneinander und sind phosphoryliert. Das lineare Produkt der inversen PCR kann somit ohne zusätzliche Phosphorylase-Behandlung „blunt end“ ligiert werden (DNA-Ligasen benötigen zur Ligation phosphorylierte 5'-Enden). Die bei der inversen PCR verwendete *Klentaq*- bzw. *Avantage2* Polymerase produziert 3'-Überhänge. Bei einer direkten Ligation des PCR-Produkts würde dies zu einer Verschiebung des Leserahmens im *cob*-Gen-Fragment führen. Aus diesem Grund wurden die überstehenden 3'-Enden mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase abverdaut („*geblunted*“).

Für die inverse PCR wurde folgendes Temperaturprofil eingesetzt:

### **Temperaturprofil:**

zu Beginn:

Denaturierung ..... 3 min      94°C

Die folgenden 3 Schritte wurden 30 x wiederholt:

Denaturierung ..... 1 min      94°C

Annealing..... 1,5 min      50-55°C

Elongation..... 4 min      68°C

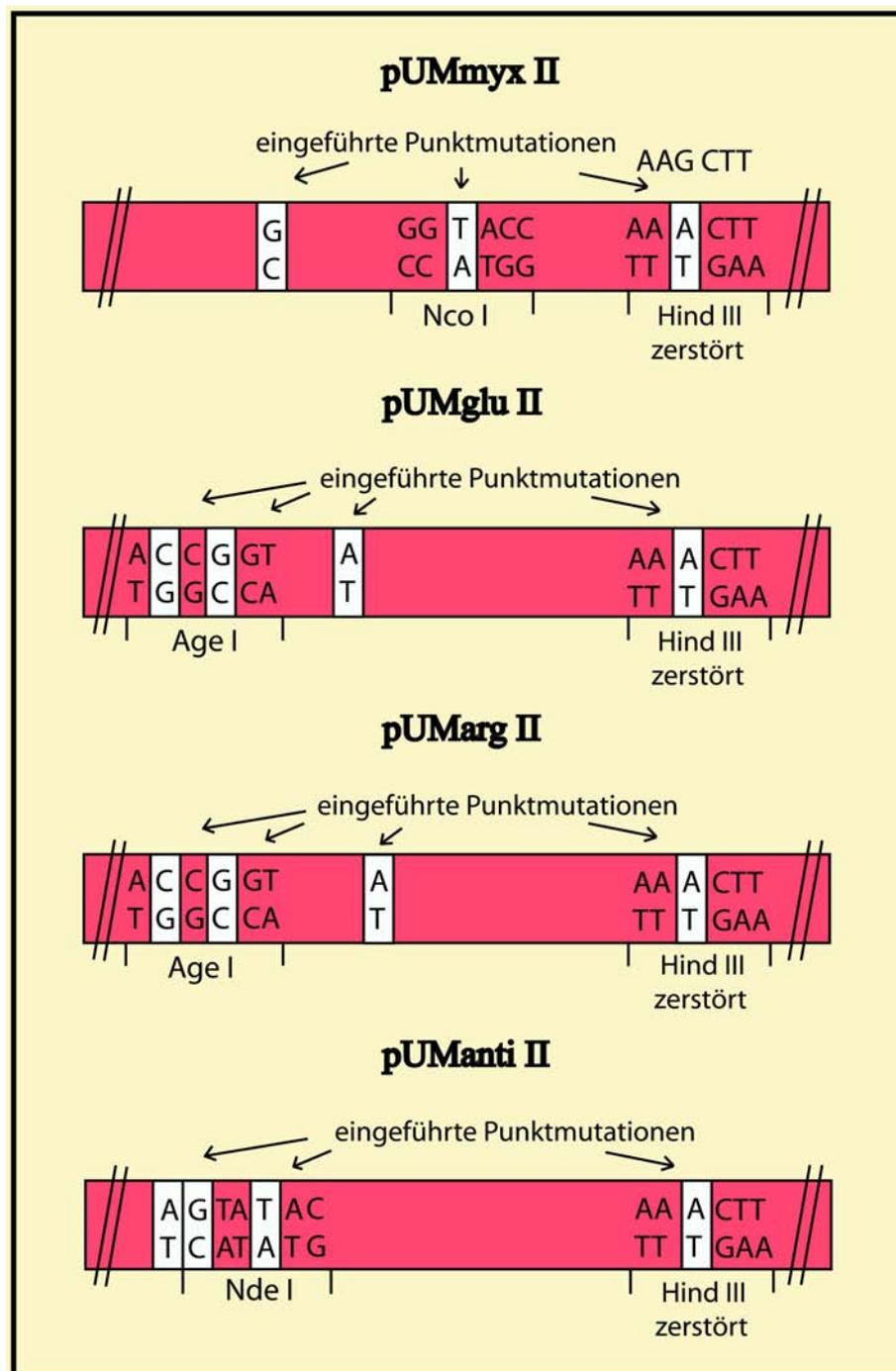
abschließend:

Elongation..... 10 min      68°C

Nach der inversen PCR und der Religation des PCR-Produkts muss vor der nachfolgenden Transformation in *E.coli* ein Restriktionsverdau durchgeführt werden. Durch das Restriktionsenzym *Dpn I* wird die PCR-Matrize (*cob*-Gen-Fragment in pUC19) verdaut, die sich vom PCR-Produkt nur durch Methylierungen an spezifischen Basen unterscheidet. Diese Methylierungen stammen von der *in vivo*-Synthese der „template“-DNA in Bakterien. Diese „template“-DNA liegt unter anderem in einer „supercoiled“-Struktur vor, einer Konformation, die eine sehr viel höhere Transformationseffizienz aufweist als das religierte PCR-Produkt. Um den Nachweis einer mitochondrialen Punktmutation zu erleichtern, wurde bei allen so erzeugten Transformationskassetten eine zweite inverse PCR durchgeführt. Die Primerauswahl wurde so gewählt, dass eine im *cob*-Gen-Fragment vorhandene *Hind III*-Restriktionsschnittstelle zerstört wurde (siehe Kapitel 3.1.2). Die Identität der erzeugten Punktmutationen im *cob*-Gen-Fragment wurde durch PCR, Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. In Tab. 2.2 sind die zur inversen PCR eingesetzten Primer aufgelistet. Abb. 2.2 zeigt die mitochondrienspezifischen Transformationskassetten.

**Tab. 2.2 Oligonukleotide zur Herstellung von Transformationsvektoren durch inverse PCR.** Rot markierte Nukleotide symbolisieren eingeführte Punktmutationen im Vergleich zur WT-cob-Sequenz. Unterstrichene Bereiche zeigen die einzuführende zusätzliche Restriktionsschnittstelle.

Transformations-vektoren	Primer for / rev	Restriktionsschnittstellen
pUM $myx$ I	for: 5' <sup>P</sup> TATCCTATAA <b>G</b> AGCTGTCACAA 3' rev: 5' <sup>P</sup> TGTACTA <b>CCAT</b> GGGGTCAGA 3'	<i>Nco</i> I
pUM $glu$ I	for: 5' <sup>P</sup> TATAG <b>A</b> ATATGTACTACCT 3' rev: 5' <sup>P</sup> AAA <b>CCGGT</b> CACAATCATT 3'	<i>Age</i> I
pUM $arg$ I	for: 5' <sup>P</sup> TATA <b>A</b> GATATGTACTACCT 3' rev: 5' <sup>P</sup> AAA <b>CCGGT</b> CACAATCATT 3'	<i>Age</i> I
Zerstörung der <i>Hind</i> III Schnittstelle	for: 5' <sup>P</sup> ATTACTGTAGCTCCCCAA 3' rev: 5' <sup>P</sup> TACAAG <b>T</b> TTAGCTAGCGCCATA 3'	

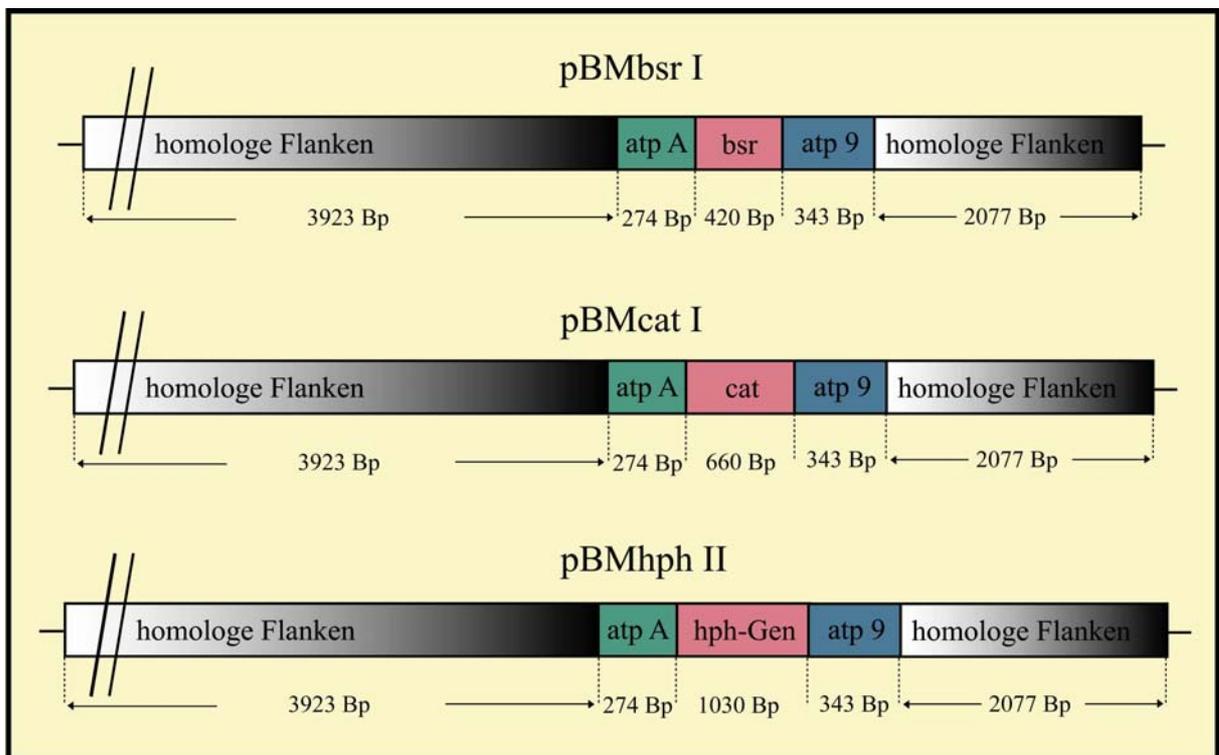


**Abb. 2.2 Mitochondrienspezifische Transformationskassetten.** Die weißen Kästchen zeigen die in das *cob*-Fragment eingeführten Punktmutationen. Die unterschiedlichen Basenaustausche vermitteln Resistenzen gegenüber Myxothiazol, Moa-Stilben oder Antimycin oder schaffen eine neue neutrale bzw. zerstören eine vorhandene Restriktionsschnittstelle.

#### 2.4.8 Aufbau der mitochondrialen Transformationskassetten mit einem resistenzverleihenden Markergen

Zu Beginn der Arbeit standen drei mitochondriale Transformationskassetten zur Verfügung, die von Rita Dorsch und Ralph Bock konzipiert und hergestellt wurden. Der Aufbau der einzelnen Transformationskassetten ist bis auf das eingeführte Resistenzgen identisch. Als

Resistenzgene wurden das *bsr*-Gen, das *cat*-Gen und das *hph*-Gen verwendet. Der Aufbau der Transformationskassetten wird in Abb. 2.3 dargestellt.



**Abb. 2.3 Aufbau der mitochondrialen Transformationskassetten mit einem resistenzverleihenden Markergen.** Die Transformationskassetten enthalten neben den Resistenzgenen *bsr*, *cat* oder *hph* den heterologen mitochondrialen *atp A*-Promotor aus *Oenothera berteriana* sowie den *atp 9*-Terminator aus *Pisum sativum*. Die flankierenden mitochondrialen Flanken stammen von einem 6,3 kB großen *Sac I*-Fragment und enthalten *orf87*, *nad3* und *rps12*.

#### 2.4.9 Modifikation des mitochondrialen Transformationsvektors pBMhphII

Zur besseren Integration und Analyse des 10,3 kB großen Transformationsvektors pBMhph II wurden im Laufe dieser Arbeit die mitochondrialen tabakhomologen flankierenden Sequenzen mit Hilfe der PCR-Klonierung verkürzt. Bei der Klonierung von pBMhph III wurden vorhandene Primer verwendet, die ursprünglich zur Analyse der mitochondrialen Transformanten entwickelt wurden (Kapitel 2.4.6). Die verkürzte Transformationskassette wurde per „blunt end“-Ligation in einen pUC19-Vektor kloniert. Die Herstellung des Transformationsvektor pBMhph IV wurde mit speziell entwickelten Primern durchgeführt. Die verkürzte Transformationskassette wurde in diesem Fall über eine „sticky end“-Ligation in einen pUC19-Vektor kloniert. Die Transformationsvektoren konnten dadurch auf 6,8 kB bzw. 5,3 kB reduziert werden. Abb. 2.4 gibt eine schematische Übersicht der Klonierungen.

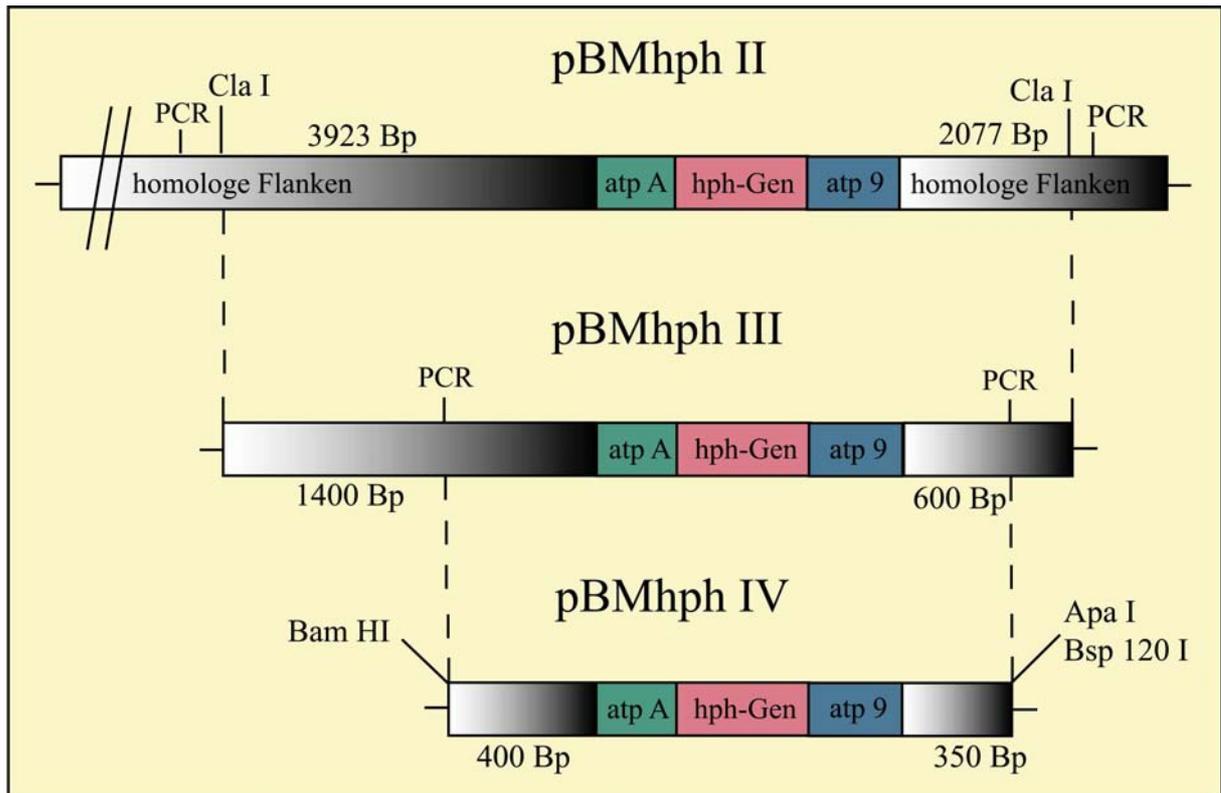
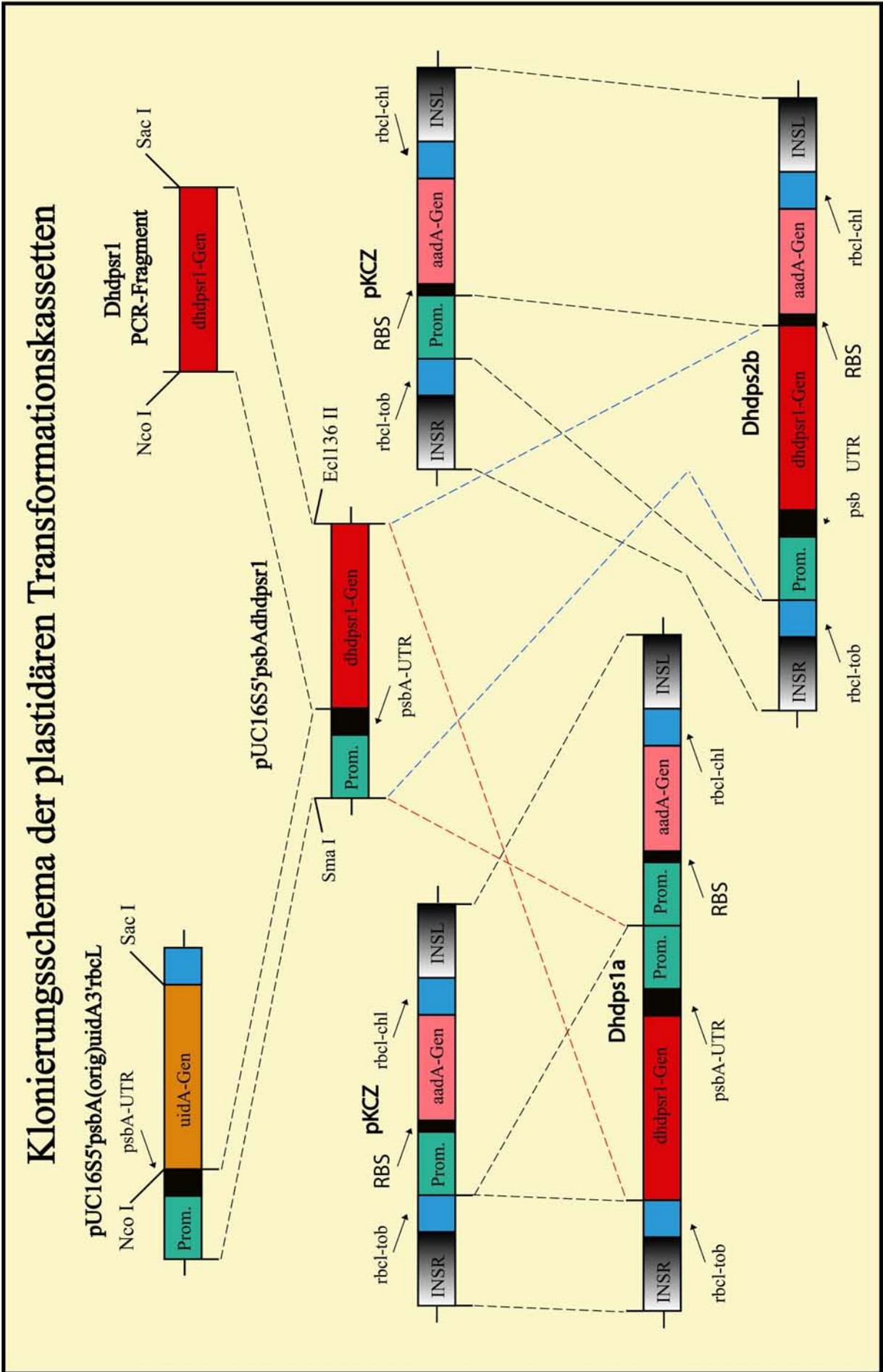


Abb. 2.4 Modifikation des Transformationsvektors pBMhph II.

#### 2.4.10 Herstellung der plastidären Transformationsvektoren

Die Herstellung der plastidären Transformationsvektoren wurden nach der in Abb. 2.5 gezeigten Klonierungsstrategie hergestellt. Das mittels PCR amplifizierte *dhdpsr1*-Gen wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *SacI* geschnitten und in die plastidäre Reportergen-Kassette pUC16S5'*psbA*(orig)*uidA*3'*rbcL* „sticky end“ kloniert, nachdem das *uidA*-Gen und die 3'*rbcL* mit den gleichen Enzymen aus dem Vektor ausgeschnitten wurde. Der neu kreierte Vektor pUC16S5'*psbAdhdpsr1* enthält den plastidären 16S Promotor, die *psbA*-5'UTR und das *dhdpsr1*-Gen und wurde für weitere Klonierungsschritte benutzt. Die 16S5'*psbAdhdpsr1*-Kassette wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SacI* ausgeschnitten und in den universalen plastidären Transformationsvektor pKCZ kloniert. Dabei wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurde die 16S5'*psbAdhdpsr1*-Kassette in entgegengesetzter Orientierung als das *aadA*-Gen integriert, zum anderen wurde die 16S 5'*psbAdhdpsr1*-Kassette so in den pKCZ kloniert, dass beide Gene in gleicher Orientierung unter Kontrolle des 16S Promotor vorlagen. Die korrekte Klonierung der neu entstandenen Transformationsvektoren pHoDh1a und pHoDh2b wurde per PCR und Sequenzierung kontrolliert.

Abb. 2.5 Klonierungsstrategie der plastidären Transformationskassetten



## 2.5 Methoden zur Analyse von DNA

### 2.5.1 Allgemeine Methoden

Die eingesetzten analytischen Techniken lehnten sich weitgehend an übliche Standard-Protokolle (Sambrook *et al.* 1989) bzw. an die Herstellerprotokolle der verwendeten Reagenzien-Kits an. Im Folgendem werden insbesondere Abweichungen gegenüber diesen Protokollen und die Auswahl der verwendeten Kits beschrieben.

### 2.5.2 Isolierung von DNA aus Tabakpflanzen

Für die Präparation von DNA aus Tabakblättern und Kalli wurde das „DNeasy Plant Mini bzw. Maxi“-Kit-System der Firma Qiagen (Hilden) eingesetzt. Falls größere Mengen von DNA aus Tabakblättern benötigt wurden, wurde auch die einfach und billig durchzuführende CTAB- (Cetyltriethylammoniumbromid)-Methode verwendet. Zum Homogenisieren des Pflanzenmaterials wurden entweder frische Blätter und Kalli mit flüssigem Stickstoff zermörsert oder lyophilisierte Pflanzenteile bei Raumtemperatur zerrieben. Für die „DNeasy“-Präparation wurden 100 bis 200 mg Blattmaterial (Frischgewicht) eingesetzt. Die Elution der Gesamt-DNA von den Qiagen-Säulchen erfolgte mit einer gegenüber den Herstellerangaben halbierten Menge an Elutionspuffer, da ansonsten die Konzentration der erhaltenen DNA ohne vorherige Konzentration durch Präzipitation zu gering für eine Analyse nach „Southern“ war. Die DNA-Extraktion mit CTAB wurde, modifiziert nach Murray und Thompson (1980), durchgeführt: 100 bis 200 mg homogenisiertes Pflanzenmaterial wurden mit 700 µl Extraktionspuffer versetzt und 20 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurde die gleiche Menge eines CHCl<sub>3</sub>:Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) zugegeben, geschüttelt und zentrifugiert (5 min, 15000 UpM). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 700 µl Isopropylalkohol ausgefällt. Das getrocknete DNA-Sediment wurde in 200 µl TE (pH8) und RNase A (Endkonzentration 100 µg/ml) gelöst und erneut mit LiCl (Endkonzentration 0,4 M) und 500 µl Ethanol über Nacht ausgefällt. Nach zweimaligem Waschen der pelletierten DNA mit 70 % Ethanol wurde sie in 100 µl TE (pH8) gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

**CTAB-Extraktionspuffer**

CTAB.....	2 %
EDTA.....	20 mM
NaCl.....	1400 mM
PVP (40 kDa).....	1 %
Tris-HCl (pH 8).....	100 mM
Autoklavieren	

Sollte aus sehr geringen Mengen Blatt- und Kallusgewebe DNA isoliert werden, wurde folgende Methode verwendet: Etwa 30-50 mg Kallusgewebe (~10-20 mg Blattmaterial) wurden in 200 + 400 µl Lysispuffer homogenisiert, 5 min bei 37°C inkubiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die DNA mit Phenol extrahiert und mit Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 10-20 µl RNase-haltigem TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen. Die auf diesem Weg gewonnene DNA konnte direkt für PCR-Analysen verwendet werden.

**Lysispuffer**

Harnstoff (Urea).....	7 M
NaCl.....	0,3 M
Tris-HCl (pH 8,0) .....	50 mM
N-Lauryl-Sarcosine.....	1%
EDTA (pH 8,0) .....	20 mM
in H <sub>2</sub> O lösen, autoklavieren; Lagerung bei 4°C oder -20°C	

**Southern-Analyse und verwendete DNA-Sonden**

Für die Southern-Analyse von Plastomtransformanten wurden 5 µg, für die Southern-Analyse von Chondriomtransformanten wurden 12-15 µg verdauter Gesamt-DNA in einem Agarosegel für mindestens 24 h bei 30 V aufgetrennt und auf eine N+ Nylonmembran nach der Kapillarblotmethode übertragen. Transfermedium war stets 0,4 M NaOH. Die Fixierung der DNA an die Membran wurde in einer UV-Kammer durchgeführt. Sowohl die Vorhybridisierung als auch die Inkubation mit der radioaktiven Sonde erfolgte mit dem Hybridisierungspuffer nach Church und Gilbert (1984) bei 63°C über Nacht oder mit dem „Rapid-Hyb-Buffer“ in 2h (0,5-1 h Prähybridisierung; 1-1,5 h Hybridisierung). Nach dem Waschen der Membranen wurden sie bis zu 10 Stunden lang auf Biomax-Filmen oder weniger als eine Stunde auf „Phosphorimager-Platten“ exponiert. Die Detektion der Signale auf Phosphorimager-Platten erfolgte mit einem Phosphorimager.

**Hybridisierungspuffer (nach Church und Gilbert, 1984)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5).....	250 mM
SDS .....	7 % (w/v)

Für die Southern- und Northern- Analyse potentieller Transformanten wurden folgende Fragmente als DNA-Sonden eingesetzt (Tab. 2.3):

**Tab. 2.3 DNA-Sonden zur Charakterisierung der plastidären und mitochondrialen Integration**

DNA-Sonden	Fragmentgröße (Bp)	Primerkombinationen (for/rev)
„aadA“	795	for: 5' ATGGCTCGTGAAGCGGTT 3' rev: 5' CTGCAGTTATTTGCCAAC 3'
„dhds“	918	for: 5' CTCCCATGGATGACATAAAAAGCACTTCGAT 3' rev: 5' CTCGAGCTCCTAATACCGACCCACCAAAAT 3'
„INSR“	1123	for: 5' CGAATTGCCGCGAGCAAAG 3' rev: 5' CCGGTAGACTTGAACCTTG 3'
„cob“	575	for: 5' ATGACTATAAGGAACCAA 3' rev: 5' AGTAAATAATGAAGACTA 3'
„hph“	1030	for: 5' TATGAAAAAGCCTGAACT 3' rev: 5' TTTTCTAGACTATTCCTTTGCCCTCG 3'
„Sonde2“	482	for: 5' GCAGAATAAGGTGAAGGTGG 3' rev: 5' CAGTCACGGACTACTTGAC 3'
„5'-Primer“	923	for: 5' CGTACAGGCTTGACGGAG 3' rev: 5' TTGGAAGATCGACGACGG 3'

Die Sondenfragmente wurden per PCR amplifiziert und mit dem PCR-Purifikation-Kit aufgereinigt oder aus einem Agarosegel eluiert. Anschließend wurden sie mit dem „Klenow Labelling Kit“- $\alpha$ -<sup>32</sup>P markiert. Zum Abtrennen der nicht eingebauten Nukleotide wurden MicroSpin Columns eingesetzt. Alle Southern-Analysen wurden durch eine geeignete Auswahl der Sonden und des Southern-Verdaus so durchgeführt, dass nicht nur die Anwesenheit, sondern auch die richtige Insertion des Transgens (im Rahmen des Auflösungsvermögens) überprüft werden konnte.

#### 2.5.4 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Nachfolgend ist der „Standardansatz“ für die PCR angegeben. Davon ausgehend wurden, falls keine Signale auftraten oder die Spezifität nicht ausreichend war, Optimierungsexperimente durchgeführt. Zur Optimierung wurden die Konzentrationen von Magnesiumchlorid, der

Primer, der Nukleotide und der Matrizen-DNA variiert sowie das Temperaturprofil angepasst. Bei Bedarf wurden hitzestabile DNA-Polymerasen eingesetzt, die einen sogenannten „hot start“ ermöglichen und eine erhebliche Verbesserung der Spezifität erreichen. Zur Amplifikation von langen PCR-Fragmenten wurde das Extensor Long-PCR-System verwendet, welches die Amplifikation von bis zu 23 kB großen PCR-Fragmenten ermöglicht.

#### **„PCR-Standardansatz“ (50 µl)**

DNA.....	0,1 bis 10 ng
Qiagen Probenpuffer.....	1 x
MgCl <sub>2</sub> .....	1,5 mM
Primer 1 .....	0,5 µM
Primer 2 .....	0,5 µM
dNTP-Mischung .....	200 µM (pro Nukleotid)
Taq-DNA-Polymerase .....	0,2 u

#### **„Standard-Temperaturprofil“**

zu Beginn:

Denaturierung .....	3 min	94°C
---------------------	-------	------

Die folgenden 3 Schritte wurden 30 bis 35 x wiederholt:

Denaturierung .....	1 min	94°C
---------------------	-------	------

„Annealing“ .....	0,5 min	(T <sub>M</sub> – 5°C)
-------------------	---------	------------------------

Polymerisation .....	0,5 min/kB	72°C
----------------------	------------	------

abschließend:

Polymerisation .....	5 min	72°C
----------------------	-------	------

### **2.5.5 Mini-PCR**

Die Mini-PCR diente als Schnell-Test zum Nachweis von transformierten Bakterienklonen. Dabei wurden 25 µl PCR-Ansatz (ohne DNA-Matrize) mit einem Zahnstocher oder Pipettenspitze angeimpft, mit dem zuvor eine Bakterienkolonie gepickt worden war. Zudem wurde noch ein Ausstrich auf einer LB<sub>amp</sub>-Agarplatte gemacht. Für die Mini-PCR ist es ausreichend, Bakterien in den PCR-Ansatz zu geben, die die Matrizen-DNA enthalten. Die PCR-Ansätze konnten direkt für Testverdaus eingesetzt werden.

**Mini-PCR-Ansatz (25 µl):**

DNA (Zahnstocher-oder Pipettenspitze mit Bakterienkolonie)

Qiagen-DNA-Polymerase-Puffer..... 1 x

MgCl<sub>2</sub>..... 1,5 mM

Primer 1 ..... 30 pM

Primer 2 ..... 30 pM

dNTP-Mischung ..... 200 µM (je Nukleotid)

*Taq* DNA-Polymerase..... 1,25 u

Das Temperaturprofil entsprach dem Standard-Temperaturprofil.

**2.5.6 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierungen der Transformationsvektoren und der Zwischenkonstrukte wurden zum Teil am Sequenzierungs-Gerät der Arbeitsgruppe von Prof. Herrmann (Botanisches Institut der LMU München) durchgeführt. Der Hauptteil der Sequenzierungen wurde bei der Firma Toplab (jetzt Medigenomix), Martinsried bei München durchgeführt.

**2.6 Methoden zur Analyse von RNA****2.6.1 Isolierung von RNA aus Tabakpflanzen**

RNA wurde aus Tabakpflanzen isoliert, die entweder unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben oder in Anwesenheit des Extraktionspuffers in einer Kugelmühle („beadbeater“) gemahlen wurden.

Bei der Kugelmühle erwiesen sich die Homogenisierungsdauer und die Größe der verwendeten Glaskugeln als entscheidend für Ausbeute und Qualität der RNA. Nach einer Optimierung dieser Parameter konnte mit dem „beadbeater“ ein sehr effektiver Gewebeaufschluss kleiner Probenmengen bei reproduzierbarer Ausbeute – was vor allem für die quantitativen Analysen wichtig war - erzielt werden. Etwa 20 mg Pflanzenmaterial wurden in kleine Stücke geschnitten und in ein Schraubdeckel-Reaktionsgefäß mit Glasperlen (ca. 500 mg, Durchmesser 1 mm) und 200 µl Extraktionspuffer gegeben. Das Gemisch wurde zunächst auf Eis abgekühlt, um die beim Zerreiben auftretende Erwärmung auszugleichen. Dann wurde bei höchster Leistungsstufe 40 Sekunden homogenisiert und danach die restlichen 250 µl Extraktionspuffer zugegeben.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde das „RNeasy plant kit“ nach dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Die isolierte RNA wurde in Elutionspuffer (Qiagen-Kit) bei –80°C gelagert.

### 2.6.2 RNA-Agaroseelektrophorese und Northern-Hybridisierung

Die aus den Tabakpflanzen isolierte Gesamt-RNA wurde auf denaturierenden Formaldehyd/Agarosegelen aufgetrennt und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid im UV visualisiert oder zur Northern-Hybridisierung auf eine Nylonmembran übertragen („geblottet“).

#### MOPS-Puffer (10 x konz.)

MOPS.....	200 mM
NaAc.....	50 mM
EDTA.....	10 mM

#### RNA-Ladepuffer

Formamid, deionisiert.....	570 µl
Formaldehyd (37 %).....	150 µl
MOPS-Puffer (10 x konz.).....	170 µl

#### Denaturierendes Formaldehyd/Agarosegel (1,2 %)

H <sub>2</sub> O.....	86 ml
Agarose.....	1.2 g
Agarose durch Aufkochen vollständig lösen.	
Nach Abkühlung auf ca. 50°C zugeben:	
MOPS (10 x konz.).....	10 ml
Formaldehyd (37 %).....	4 ml

Für die Gelelektrophorese wurde die in TE-Puffer gelöste RNA mit 1,8 Volumen RNA-Ladepuffer gemischt, zur Denaturierung für 10 min bei 60°C inkubiert, dann für einige Minuten auf Eis gestellt und nach dem Auftragen auf ein Formaldehyd/Agarosegel bei 80 V in einer Elektrophoresekammer mit Pufferumwälzung aufgetrennt. Zum Überprüfen von Qualität und Mengen der RNA wurden Testgele in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg / ml in H<sub>2</sub>O) angefärbt und auf dem UV-Transilluminator photographiert. „Northern-Gele“ wurden nicht mit Ethidiumbromid angefärbt. Eine gleichmäßige Beladung wurde durch eine densitometrische Messung vorher hergestellter Testgele gewährleistet.

Zum Transfer der RNA auf eine Hybond-N<sup>+</sup>-Nylonmembran wurde das Gel ohne weitere Behandlung auf eine Kapillarblot-Apparatur gelegt und über Nacht „geblottet“. Als Transfermedium diente SSC (10 x konz.). Nach dem Transfer wurde die Membran in SSC (2 x konz.) gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Fixieren an die Membran wurde in einem „UV-crosslinker“ durchgeführt.

Sowohl die Vorhybridisierung als auch die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde erfolgte in dem Hybridisierungspuffer nach Church et. al. (siehe Kap.2.5.3) bei 65°C über Nacht. Das Waschen und die Autoradiographie der Membranen wurde analog den „Southern-Blots“ (Kap.2.5.3) durchgeführt.

## 2.7 Nachweis des GUS-Proteins

### 2.7.1 Histologischer GUS-Nachweis

Das in den transgenen Pflanzen exprimierte GUS-Protein kann durch Inkubation des Pflanzenmaterials mit dem Substrat X-Gluc (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid) direkt nachgewiesen werden. Bei der nach Fütterer et al. (1995) durchgeführten histologischen Färbung wird X-Gluc durch das GUS-Protein in 5-Brom-4-chlor-indoxyl und Glucoronat gespalten. 5-Brom-4-chlor-indoxyl dimerisiert oxidativ zu dem blauen Indigoderivat 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo.

Suspensionskulturen von transgenem *rpo*-Tabak wurden mit der X-Gluc-Färbelösung vakuumfiltriert und bei 37°C maximal 24 h inkubiert.

#### X-Gluc-Färbelösung

Phosphatpuffer (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), pH 7.....	100 mM
EDTA.....	1 mM
Kaliumhexacyanoferrat(II).....	1 mM
Kaliumhexacyanoferrat(III) .....	1 mM
Triton X-100 .....	0,3 %
X-Gluc (in DMF).....	1 mM

## 2.8 Bestimmung des Lysingehaltes

Um die Funktion des in die Plastiden transformierten *dhpsr1*-Gens zu überprüfen, wurde eine Analyse des Lysingehaltes vorgenommen. Zur Bestimmung des frei verfügbaren Lysins im Blattmaterial von Tabakpflanzen wurde das Pflanzenmaterial homogenisiert, die Aminosäuren durch Phenylisothiocyanat (PITC) derivatisiert und anschließend der Gehalt der entsprechenden Aminosäure mittels HPLC bestimmt.

### 2.8.1 Homogenisierung des Pflanzenmaterials

Ca. 250 mg Blattmaterial oder 400 mg Kallusmaterial wurden in einem „Potter“ mit 5 ml Extraktionsmedium (Methanol:Chloroform:H<sub>2</sub>O=12:5:1) mit Hilfe eines Glasstabs homogenisiert und in ein 10 ml-Kulturröhrchen mit Dichtungsring und Teflondeckel überführt. Das Homogenat wurde 5 min bei 2000 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand mit 1,5 ml H<sub>2</sub>O und 3 ml Chloroform versetzt und die entstehenden Phasen durch

vorsichtiges Auf- und Abschwenken gemischt. Durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 2000 x g entstanden zwei Phasen: eine untere grüne organische Phase, in der z.B. Chlorophyll gelöst war, und eine obere klar durchsichtige wässrige Phase, in der sich die gelösten Aminosäuren befanden. Etwa 2 x 1,5 ml dieser oberen Phase wurden abgenommen und in je ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Fraktion wurde eingefroren, sie diente als sog. „basement“ für eventuell folgende Versuche. Die andere Fraktion wurde mindestens 6 h in der Speed-Vac getrocknet.

### **2.8.2 PITC-Derivatisierung**

Das erhaltene Pellet wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst, 5 min bei 12.000 x g zentrifugiert und 20 µl des Überstandes für die Derivatisierung verwendet, der Rest wurde für eventuell folgende Aminosäuregehaltsbestimmungen eingefroren. Die entnommenen 20 µl wurden mit 180 µl Methanol/Triethylamin/Phenylisothiocyanat (Volumenverhältnis 7:1:1) gemischt und bei Raumtemperatur 20 min zur Derivatisierung stehen gelassen. Die derivatisierten Aminosäuren wurden im Speed-Vac ca. 100 min bei Hitze und anschließend 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und das Pellet anschließend in 400 µl 10 mM Natriumacetat (pH5,7) gelöst. Zur Reinigung der Proben wurden 200 µl Dichlormethan zugegeben, „gevortext“, 5 min bei 12000 x g zentrifugiert und die obere wässrige Phase durch die gleiche Prozedur nochmals gereinigt.

### **2.8.3 Aminosäuregehaltsanalyse mittels HPLC**

200 µl der nach der Aufreinigung erhaltenen wässrigen Phase wurde in HPLC-Glasgefäße überführt und davon 50 µl in die HPLC eingespritzt. Die Auftrennung in der HPLC erfolgte durch die „Reversed-Phase“-Chromatographie. Die durch die Derivatisierung entstandenen PTC-Derivate sind relativ stabil und besaßen laut unseren Spektren für die Isolierung aus Tabak ein Absorptionsmaximum bei 254 nm (im Gegensatz zu einem Absorptionsmaximum von 248,6 nm bei der Lösung von reinem PTC-Lysin). Der Gehalt der jeweiligen Aminosäure wurde anhand der Fläche der durch den UV-Detektor erfassten Peak bestimmt.

Die Auftrennung erfolgte über den in Tabelle 4 angegebenen Gradienten. Die ermittelte Retentionszeit für PTC-Lysin war 9,8 Minuten. (für PTC-Lysinspektrum und Chromatogramme s. Anhang B.1):

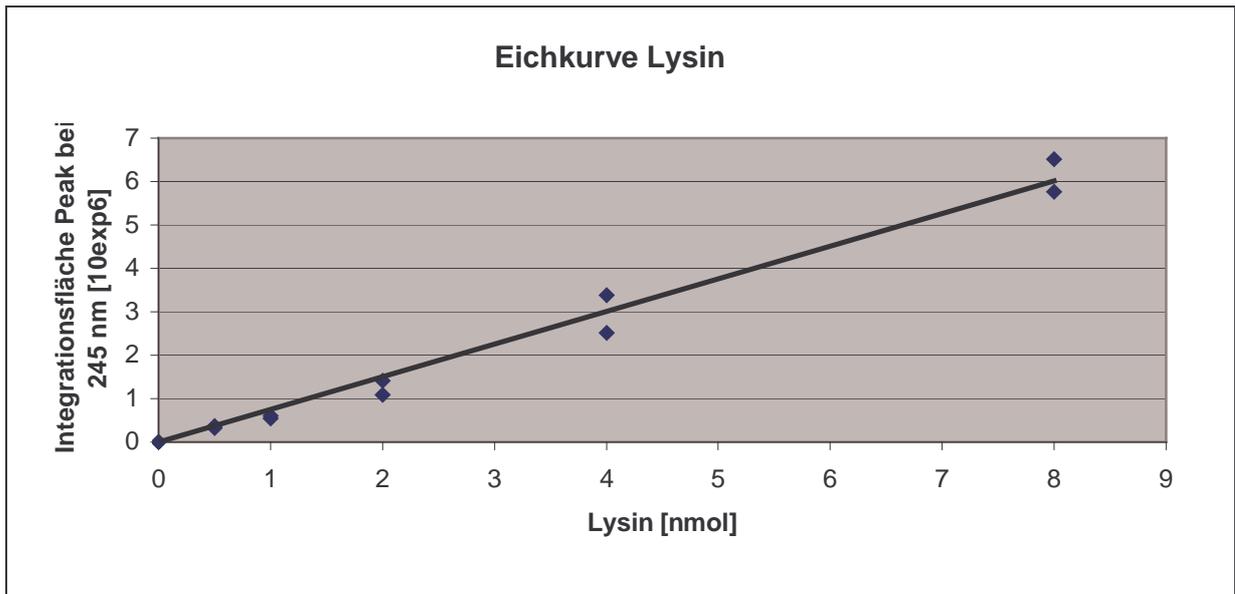
- Laufmittel A: 1% Essigsäure in Wasser
- Laufmittel B: Acetonitril
- Durchlauf: 1 ml/min
- Temperatur: 35°C

**Tab. 2.4 Gradientenprogramm für die Aufreinigung von PTC-Lysin aus Tabaktransformanten**

Schritt	Zeitpunkt [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
1	0	70	30
2	15	40	60
3	17	40	60
4	20	70	30

**Eichkurvenerstellung:**

Um die Integrationsflächen der Peaks des UV-Detektors auf die Menge des gebildeten Lysins umrechnen zu können und um einen Standardwert für die eigenen Proben zu erhalten, musste eine Eichkurve erstellt werden. Aus folgenden Lysinkonzentrationen wurde eine Regressionsgerade mit der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt: 0 nmol, 0,5 nmol, 1 nmol, 2 nmol, 4 nmol und 8 nmol L-Lysin. Für jede Konzentration wurde der durchschnittliche Flächenwert bestimmt und daraus die Eichkurve nach dem Prinzip der minimalen Abweichung ermittelt (Abb.2.6).



**Abb. 2.6 Eichkurve zur Bestimmung des Lysingehaltes** Die Punkte stellen die gemessenen Flächen unter den Peaks dar, die Gerade ist die Regressionsgerade, die nach der Methode der kleinsten Quadrate bestimmt wurde.

Die Regressionsgerade ist wie folgt definiert:  $y = 752653 x$ , d.h. die integrierte Fläche des UV-Peaks von Lysin bei 1 nmol beträgt 752653 Einheiten. Die Abweichung der einzelnen Punkte im Vergleich zur Regressionsgeraden ist gering genug, um die Eichkurve für die Auswertung des Pflanzenmaterials verwenden zu können.

## 2.9 Stabile Transformation des Plastiden- und Mitochondriengenoms

### 2.9.1 „In vitro“-Kultur von Tabakpflanzen

Für die Sterilkultur von Tabakpflanzen wurden die Oberflächen der Samen in Petrischalen sterilisiert und auf B5-Medium ausgelegt:

#### „Sterilisieren“ von Tabaksamen

70 % Ethanol.....	1 min
5 % Dimanin C .....	10 min
H <sub>2</sub> O steril .....	3 x 10 min

Die Anzucht erfolgte in 9cm Petrischalen in einer Klimakammer bei 25°C, ca. 2000 Lux (16 h Licht/Tag). Nach 7-10 Tagen wurden die Keimlinge in Kirschgläser mit gasdurchlässigem Stopfen umgesetzt. Das Alter der zur Transformation benutzten WT-Pflanzen stellt einen entscheidenden Parameter für die Regeneration der Protoplasten und die Effizienz der Transformation (zumindest bei Kern- und Plastomtransformationen) dar. Aus diesen Gründen wurden ausschließlich Blätter von drei bis vier Wochen alten Tabakpflanzen für

Transformationen verwendet. Da die Samenbildung der *rpo*-Mutanten *in vitro* gering ist, wurden die Pflanzen durch Abtrennen der Sprossspitze und Umsetzen derselben subkultiviert, so dass ständig geeignetes Pflanzenmaterial für die Mitochondrientransformation zur Verfügung stand

**Kulturmedien:****Ammonium-Succinat (2 M)**

Succinat..... 23,6 g

NH<sub>4</sub>Cl ..... 10,6 g

KOH..... 22,4 g

pH 5,6; steriltrieren

**Tab. 2.5 Kulturmedien für Tabak.** Alle Angaben in mg/l Endkonzentration bzw. ml Stammlösung. Für die Makro-Salze wurde eine 10-fache, für die Mikro-Salze und Vitamine jeweils eine 100-fache Stammlösung angesetzt, die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurde. B5-Medium nach Gamborg et al. (1968); F-PCN und F-PIN nach Dorvzhenko et al. (1998). Die Salz-Konzentrationen von RMOP und TM entsprechen denen des MS-Mediums nach Murashige und Skoog (1962).

		B5	F-PCN	F-PIN	RMOP	TM	VBW-Mod.
Makro-Salze	$\text{NH}_4\text{NO}_3$				1650	1650	1650
	$\text{KNO}_3$	2500	1012	1012	1900	1900	1900
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150	440	440	440	440	440
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	370	370	370	370	370
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$		170	170	170	170	170
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150					
Mikro-Salze	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134					
	$\text{NH}_4$ -Succinat		10ml	10ml			
	EDTA-Fe(III) Na-Salz	40	40	40	40	40	40
	KJ	0,75	0,75	0,75	0,83	0,83	0,83
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	3,00	3,00	3,00	6,20	6,20	6,2
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,00	10,00	10,00	22,3	22,3	22,3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,00	2,00	2,00	8,60	8,60	8,6
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Vitamine	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
	Inosit	100	200	200	100	100	100
	Pyridoxin-HCl	1	2	2		0,5	1
	Thiamin-HCl	10	1	1	1	0,1	10
	Biotin		0,02	0,02			
	Glycin					2	
	Nicotinsäure	1	2	2		0,5	1
	BAP		1	1	1	1	
	NAA		0,1	0,1	0,1	0,1	
Sonstiges	IAA						2
	Kinetin						0,2
	Polypuffer 74		10 ml	10 ml			
	Saccharose	2 0 000	20 000	130 000	3 0 000	20 000	30 000
	Glucose		65 000				5000
	pH	5,7 (KOH)	5,8 (KOH)	5,8 (KOH)	5,8 (KOH)	5,7 (KOH)	5,8 (KOH)
	Osmolarität		550 (mosm/l)	550 (mosm/l)			
	Agar	7000			8000	8000	8000
	Wasser ad 1l:	bidest	ultrafilt. bidest	ultrafilt. bidest	bidest	bidest	bidest

### 2.9.2 Suspensionskultur von Tabak, *rpo*-Tabak und Arabidopsis

Für die Herstellung von Tabak- und *rpo*-Tabak-Suspensionskulturen wurde Kallus- und Sprossmaterial verwendet. Das Kallus- und Sprossmaterial wurde aus Blattstücken und Protoplasten regeneriert. Die Blattstücke wurden ca. 4 Wochen, die eingebetteten Protoplasten ca. 4-6 Wochen auf RMOP-Medium im Dunkeln kultiviert. Für den Ansatz einer Suspensionskultur wurden ca. 2 g des Kallus- bzw. Sprossmaterials in kleine Gewebestücke geschnitten, in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt, mit ca. 5 ml  $\text{M}_4\text{D}$ -

Suspensionsmedium aufgefüllt und bei 160 rpm in Dunkelheit geschüttelt. Nach einer Woche wurde die Kultur durch ein feines Sieb (100 µm) dekantiert und erneut in einen 50 ml Erlenmeyerkolben mit ca. 5-10 ml M<sub>4</sub>D-Suspensionsmedium überführt. In der zweiten und dritten Woche wurde die Suspensionskultur durch ein grobes Sieb dekantiert, um sie von dem Kallus- und Sprossmaterial zu trennen. Nach und nach wurde eine grössere Menge M<sub>4</sub>D-Suspensionsmedium dazugegeben und die Suspensionskultur in grössere Erlenmeyerkolben überführt. Die so gewonnenen Suspensionskulturen können durch wöchentlichen Medienwechsel erhalten werden. Von der Arbeitsgruppe Prof. Brennicke (Universität Ulm) wurde freundlicherweise eine Arabidopsis-Suspensionskultur zur Verfügung gestellt. Als Ausgangsmaterial für die Selektions- und Transformationsversuche wurde jeweils eine Suspensionskultur ausgewählt, um gewebespezifische Unterschiede zu vermeiden.

### **2.9.3 „*In vitro*“-Kultur von Kartoffelpflanzen**

Kartoffelpflanzen der Sorte „Walli“ wurden freundlicherweise von der Lehr- und Versuchsanstalt Freising zur Verfügung gestellt. Die Kultur und Erhaltung erfolgte wie bei Tabak in Kirschgläser mit gasdurchlässigem Stopfen in einer Klimakammer bei 25°C, ca. 2000 Lux (16 h Licht / Tag). Zur Erhaltung der Kultur wurden die Sprossspitzen oder Achselmeristeme auf ½ MS-Medium weiterkultiviert. Zur „Particle gun“-Transformation, zur PEG-Transformation und für Testreihen zur Bestimmung der Selektionsbedingungen wurden Blätter von 3-4 Wochen alten Pflanzen verwendet.

**Tab. 2.6 Kartoffel-Kulturmedien und Suspensionsmedien für Arabidopsis und *rpo*-Tabak.** Alle Angaben in mg/l Endkonzentration bzw. ml Stammlösung. Für die Makro-Salze wurde eine 10-fache, für die Mikro-Salze und Vitamine jeweils eine 100-fache Stammlösung angesetzt, die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurde. Das Stage I+II Medium wurde verändert nach Sidorov et al. (1999). Das  $\frac{1}{2}$  MS-Medium wurde nach Murashige und Skoog (1962) hergestellt. Die Suspensionsmedien wurden verändert nach Kofer (pers. Mitteilung).

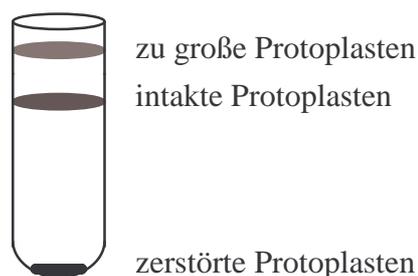
		PCK	Stage I	Stage II	$\frac{1}{2}$ MS	M <sub>4</sub> D <i>rpo</i> - Tabak	M <sub>4</sub> D Arabi- dopsis
Makro-Salze	NH <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>		1650	1650	825	2398	1650
	KNO <sub>3</sub>	950	1900	1900	950	1900	1900
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	220	440	440	220	440	440
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	185	370	370	185	370	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	170	170	85	340	170
	NH <sub>4</sub> Cl	133.75					
Mikro-Salze	EDTA-Fe(III)	40	40	40	20	40	40
	KJ	0,75	0,83	0,83	0,415	0,83	0,83
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,00	6,20	6,20	3,1	6,20	6,20
	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	10,00	22,3	22,3	11,15	22,3	22,3
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2,00	8,60	8,60	4,3	8,60	8,60
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,125	0,25	0,25
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,0125	0,025	0,025
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,0125	0,025	0,025
Vitamine	Inosit	100	100	100	50		
	Pvridoxin-HCl	1	0,5	0,5			
	Thiamin-HCl	10	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4
	Biotin		0,05	0,05			
	Glycin		2	2			
	Nicotinsäure	1	5	5		0,5	0,5
	Folsäure		0,5	0,5			
Sonstiges	Adeninsulfat		40	80			
	Caseinhydrolysa	100	100				
	Glutamin	100					
	Mvo-Inotisol					20	20
	2,4 D					1	1
	BAP	0,5	0,5				
	NAA	2	0,1				
	IAA			0,1			
	Zeatin			1			
	Kinetin					0,2	0,2
	GA			0,05		0,1	0,1
	MES		975	975			
	Saccharose	20000	25000	25000	15000	20000	30000
	Mannitol	70000	54600	36400			
	pH	5,8 (KOH)	5,8 (KOH)	5,8 (KOH)	5,8 (KOH)	5,8 (KOH)	5,8 (KOH)
	Osmolarität	550 (mosm/l)					
Agar		10000	10000	8000			
Wasser ad 1l:	ultrafilt	bidest	bidest	bidest	bidest	bidest	

## 2.9.4 Stabile PEG-Transformation von Tabakprotoplasten

Nach der hier beschriebenen Methode sollen pflanzliche Mitochondrien und Plastiden unter Verwendung geeigneter Vektoren stabil transformiert werden. Dazu wurden steril angezogene Tabak- und *rpo*-Tabakblätter sowie sterile Suspensionskulturen von *rpo*-Tabak enzymatisch protoplastiert, intakte Protoplasten über eine Stufengradienten-Zentrifugation angereichert und in Anwesenheit von PEG 1500 mit zirkulärer Plasmid-DNA inkubiert. Die Protoplasten wurden dann auf Kunststoffnetzen in Alginat eingebettet und unter Antibiotika-Selektion zur Regeneration gebracht.

### 2.9.4.1 Protoplastierung von Tabakblättern

Zur Herstellung von Protoplasten aus Blättern wurden etwa 3 Wochen alte sterile Tabakblätter verwendet. Für jeden Ansatz wurden 2-3 in feine Streifen (~ 1 mm) geschnittene Blätter für 2 h zur Präplasmolyse in F-PIN gelegt. Danach wurde das Medium gegen die Enzymlösung ausgetauscht und der Verdau-Ansatz über Nacht (16 h) im Dunkeln bei 25°C inkubiert. Die Lösung wurde dann durch ein Metallnetz (100 µm Porendurchmesser) in Polystyrolröhrchen filtriert, mit F-PCN Medium überschichtet und 10 min bei 70 g zentrifugiert. Die Bande an der Phasengrenze mit den intakten Protoplasten wurde abgesaugt und mit Transformations-Medium auf 10 ml aufgefüllt (Abb.2.7). Nach Bestimmung der Protoplasten-Dichte in einer „Fuchs-Rosenthal-Zählkammer“ wurden die Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 50 g eingengt und mit Transformations-Medium auf eine Dichte von  $5 \cdot 10^6$  PP/ml eingestellt.



**Abb. 2.7 Dichtegradienten-Zentrifugation von Tabak-Protoplasten.** Aufgrund der unterschiedlichen Dichten der Medien F-PIN (unten, höhere Dichte) und F-PCN (oben, geringere Dichte) kommt es zur Trennung von zu großen, intakten und zerstörten Protoplasten.

**10 % Cellulaselösung**

Cellulase R10.....	100 g/l
Saccharose .....	137 g/l

**10 % Maceraselösung**

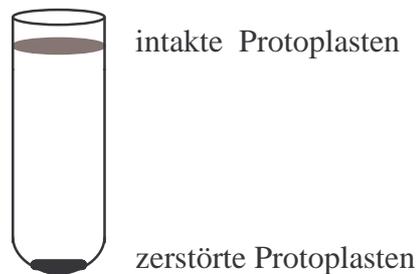
Mazerozym R10.....	100 g/l
Saccharose .....	137 g/l

**Enzymlösung I**

F-PIN .....	9 ml
Cellulaselösung.....	0,5 ml
Maceraselösung .....	0,5 ml

**2.9.4.2 Protoplastierung von *rpo*-Tabakblättern**

Im Vergleich zu der in Kapitel 2.9.4.1 beschriebenen Methode wurden einige Änderungen vorgenommen. Um einen effizienten Verdau der *rpo*-Tabakblätter zu gewährleisten, wurde die Enzymlösung II verwendet. Die isolierten Protoplasten wurden mit 1 ml W-5 Medium überschichtet und für 10 min bei 45 g floatiert. Die obere Bande mit den intakten Protoplasten wurde abgesaugt und die Protoplasten-Dichte wie beschrieben bestimmt und eingestellt. Auf eine Auftrennung der Protoplasten nach ihrer Größe wurde aufgrund der geringen Ausbeute verzichtet.



**Abb. 2.8 Dichtegradienten-Zentrifugation von *rpo*-Tabak-Protoplasten.** Aufgrund des schwach ausgeprägten Schwammparenchyms ist die Ausbeute der Protoplasten deutlich geringer als bei WT-Tabakblättern. Die Protoplastengröße variiert jedoch nicht so stark wie bei WT-Tabakprotoplasten. Eine spezielle Dichtegradientenzentrifugation zum Auftrennen von großen und optimalen Protoplasten ist nicht nötig.

**Enzymlösung II**

F-PIN .....	8 ml
Cellulaselösung.....	1 ml
Maceraselösung .....	1 ml

**W-5 Medium (100 ml)**

NaCl.....	0,9 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O.....	1,838 g
KCl.....	0,037 g
Glucose .....	ca. 0,1 g (550 mOsm)
pH 5,8 (KOH), ad ultrafiltr. H <sub>2</sub> O;	
sterilfiltrieren	

**2.9.4.3 Protoplastierung von Tabak- und *rpo*-Tabak-Suspensionskulturen**

Zur Protoplastierung von Suspensionkulturen wurden 2 g Pflanzenmaterial in 8 ml F-PIN für ca. 2 h zur Präplasmolyse inkubiert. Danach wurde das Medium gegen die Enzymlösung III ausgetauscht und für 2,5-4 h unter leichtem Schütteln weiter inkubiert. Die Isolierung der Protoplasten erfolgte nach der in Kapitel 2.9.4.1 und 2.9.4.2 beschriebenen Methode.

**10% Driselaselösung**

Driselase.....	100 g/l
Saccharose .....	137 g/l

**Enzymlösung III**

F-PIN .....	6,5 ml
Driselase.....	1,12 ml
Cellulaselösung.....	2,24 ml
Maceraselösung.....	0,224 ml

**2.9.4.4 PEG-Transformation und Protoplasten-Regeneration bei Tabak und *rpo*-Tabak**

Zur Mitochondrien- und Plastiden-Transformation wurde ausschließlich zirkuläre, mit Qiagen-Säulchen präparierte und in TE-Puffer (pH 5,6) aufgenommene Plasmid-DNA eingesetzt. Für die Transformation wurden 100µl Protoplasten-Suspension ( $5 \cdot 10^5$  PP) an den Rand einer schräg aufgestellten Petrischale pipettiert. Auf die Suspension wurden 18 µl Plasmid-DNA (50 µg), 7 µl F-PCN und 125 µl PEG-Lösung getropft und vorsichtig vermischt. Nach 7,5 min Inkubation wurden zuerst 125 µl, nach weiteren 2 min 2,6 ml F-PCN zugegeben. Die Einbettung der Protoplasten erfolgte a) durch Auftropfen von 625 µl der Protoplasten/Alginate-Mischung auf Kunststoffnetze, die bereits vorher in Petrischalen auf Ca<sup>2+</sup>-Agar gelegt worden waren („thin-alginate-layer technique“; Kofer *et al.*, 1998b; Dovzhenko *et al.*, 1998) oder b) durch Tauchen der Kunststoffnetze in die Protoplasten/Alginate-Mischung, die dann ebenfalls auf Ca<sup>2+</sup>-Agar gelegt wurden („film

culture“-Technik, Golds *et al.*, 1992). Zum Gelieren wurden sie ca. 30 bis 60 min stehen gelassen. Nach vorsichtigem Ablösen der Netze vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Agar wurden diese in Petrischalen ( $\varnothing$  6 cm) mit 10 ml F-PCN gelegt. Ein Austausch des Mediums gegen 2 ml frisches F-PCN erfolgte nach einer Stunde. Zur Zellwandbildung wurden die eingebetteten Zellen zunächst bei 25°C über Nacht dunkel gestellt, dann in der Kulturkammer bei Licht ca. 2000 Lux (16 h Licht / Tag) regeneriert. Die Bildung erster Zellkolonien konnte bereits nach 3-4 Tagen beobachtet werden. Etwa ab dem siebten Tag wurde mit Antibiotikum selektiert. Der Austausch des Mediums und der Zeitpunkt für das Übertragen der Netze auf RMOP-Festmedium erfolgte in Abhängigkeit vom jeweiligen Hemmstoff in der Regel in Abständen von 1-2 Wochen (Kapitel 2.10). Grüne bzw. weiße Kalli (potentielle Transformanten) wurden ab einer Größe von ~2-3 mm von den Netzen in 48-well-Gewebekulturschalen oder in einzelne Petrischalen transferiert.

Entstehende Sprosse wurden mehreren Zyklen wiederholter Blattstückchen- oder Kallusregeneration auf RMOP unter Beibehaltung der Selektion unterworfen, um eine Segregation des Trans-Plastoms bzw. des Trans-Chondrioms zu fördern. Danach wurden die Sprosse zur Wurzelbildung und weiteren Kultur auf B5-Medium überführt. *Rpo*-Tabaksprosse wurden zum optimalen Sprosswachstum auf VBW-Medium weiterkultiviert. Eine Bewurzelung der *rpo*-Tabaksprosse kann bei Bedarf durch Umsetzen auf B5-Medium erreicht werden. Die bewurzelten Pflanzen können in Erde gesetzt und im Gewächshaus weiterkultiviert werden.

#### **Transformations-Medium (200 ml)**

$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ..... 0,609 g

MES..... 0,2 g

Mannit..... 18 g

pH 5,6 mit KOH einstellen, auf 20 ml auffüllen; autoklavieren

**PEG-Lösung (40%)**

Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O ..... 0,413 g  
 Mannit ..... 1,275 g  
 in ultrafiltriertem Wasser gelöst und auf 17,5 ml aufgefüllt  
 PEG1500..... 10 g  
 unter Rühren lösen; pH 9,75 mit KOH einstellen; Sterilfiltrieren,  
 Aliquotieren und bei -20°C lagern

**F-Alginat (100 ml)**

MES ..... 0,137 g  
 MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O ..... 0,25 g  
 MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O ..... 0,204 g  
 Mannit ..... ca. 7,7 g auf 550 mOsm  
 Alginat ..... 2,4 g  
 pH 5,8 mit KOH einstellen, auf 100 ml auffüllen, autoklavieren

**Ca<sup>2+</sup>-Agar (1l)**

CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (20 mM)..... 2,94 g  
 MES (10 mM)..... 1,95 g  
 Mannitol..... ca. 82 g (550 mOsm)  
 pH 5,8 mit KOH einstellen, auf 1 l mit ultrafiltriertem H<sub>2</sub>O auffüllen,  
 Agar „purified“ (1%)..... 10 g  
 autoklavieren

**2.9.5 Stabile PEG-Transformation von Kartoffelprotoplasten**

In dieser Arbeit werden Kartoffelchloroplasten mit der PEG-Methode transformiert. Als Transformationsvektoren werden die Konstrukte pHoDh1a und pHoDh2b verwendet. Prinzipiell ähnelt die PEG-Transformation von Kartoffelprotoplasten der PEG-Transformation bei Tabakprotoplasten. Änderungen werden im Folgenden beschrieben.

**2.9.5.1 Protoplastierung von Kartoffelblättern**

Zum Verdau von 8-10 Kartoffelblättern wurde die Enzymlyösung W I verwendet. Die Protoplastenlösung wurde mit 2 ml Transformationsmedium anstelle von F-PCN überschichtet. Alle anderen Schritte sind identisch zur Protoplastierung bei Tabak.

**Enzymlösung W I**

F-PIN.....	8 ml
Cellulaselösung.....	1,5 ml
Maceraselösung.....	0,5 ml

**2.9.5.2 PEG-Transformation und Protoplasten-Regeneration bei der Kartoffel**

Die PEG-Transformation wird wie bei Tabak beschrieben durchgeführt. Anstelle des Tabakmediums F-PCN wird das Kartoffelmedium PCK verwendet (Tab. 2.6). Zur Zellwandbildung werden die Zellen für 2 Tage bei 25°C dunkel gestellt, dann in der Kulturkammer bei Licht, ca. 2000 Lux (16 h Licht / Tag), regeneriert. Erste Zellkolonien konnten nach sieben bis acht Tagen beobachtet werden. Die Zugabe des Hemmstoffs erfolgte in der Regel am 11. oder 12. Tag nach der Transformation. Das Umsetzen der Netze auf Stage I-Festmedium zur Kallusbildung erfolgte ca. eine Woche später. Nach weiteren zwei bis drei Wochen wurden die Netze auf das sprossinduzierende Stage II-Medium transferiert. Die isolierten Sprosse wurden auf ½ MS-Medium weiterkultiviert.

**2.9.6 „Particle gun“-Transformation von pflanzlichen Organellen**

Die „biolistische“ Transformation intakter Zellen und Gewebe wird seit 1988 bei Kern-, Plastiden-, und zum Teil auch Mitochondrientransformationen durchgeführt (Klein et al., 1987; Boyton et al., 1988; Johnson et al., 1988). Bei dieser Methode werden DNA-beschichtete Goldpartikel (0,6 µm) unter großem Druck in einer Vakuumkammer in das pflanzliche Gewebe geschossen. In dieser Arbeit wird sie alternativ zur PEG-Methode für die stabile Transformation von Mitochondrien und Plastiden verwendet.

**2.9.6.1 Beschichten der Goldpartikel mit DNA**

Die Gold-„Stocksuspension“ wird mind. 1 min geschüttelt und sofort 35 µl in ein steriles Eppi gegeben. Eppis der Firma Treff besitzen bessere Oberflächeneigenschaften als Eppis anderer Marken. Das Gold wird abzentrifugiert (10 s; 14000 rpm), der Überstand entfernt und in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert. Dann wird das Gold 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand entfernt.

**Gold-„Stocksuspension“**Goldpartikel (Gold 0,6  $\mu\text{m}$ ) ..... 60 mg

Ethanol 100 % ..... 1 ml

bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  lagern**Aufbringen der DNA auf die Goldpartikel (alle weiteren Schritte auf Eis)**

Das Gold wird in 25  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung (25  $\mu\text{g}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) resuspendiert, 220  $\mu\text{l}$  steriles Aqua bidest. hinzugeben und geschüttelt. Danach wird 250  $\mu\text{l}$  sterilfiltriertes 2,5 M  $\text{CaCl}_2$  dazugeben und erneut geschüttelt. Dann 50  $\mu\text{l}$  0,1 M Spermidin (sterilfiltriert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Aliquots gelagert) hinzugeben, gut mischen und 10 min auf Eis inkubieren. Zwischendurch wird immer wieder kurz geschüttelt.

**Reinigen der DNA-beladenen Goldpartikel**

Das Gold wird abzentrifugiert (1 min; 10000 rpm), der Überstand komplett entfernt und 600  $\mu\text{l}$  EtOH 100% dazugeben. Das Gold wird dann sorgfältig resuspendiert (mit einer 500  $\mu\text{l}$  Pipettenspitze). Dieser Waschschrift wird 1x wiederholt.

**Aufnehmen der Goldpartikel in EtOH 100%**

Das Gold wird abzentrifugiert (1 min; 10000 rpm) und der Überstand komplett entfernt. Die Goldpartikel werden in 72  $\mu\text{l}$  EtOH 100% sorgfältig resuspendiert und bis zum Gebrauch auf Eis gestellt.

**2.9.6.2 Beschuss des pflanzlichen Gewebes mit den DNA-beladenen Goldpartikeln**

Bei der Transformation von Blättern und Mikrokolonien wurden die in unserem Labor optimierten Parameter (Standardbedingungen) verwendet. Zur Transformation von pflanzlichen Suspensionskulturen wurden Vorversuche mit der Reportergen-Kassette pUC19-35S-GUS gemacht. Es wurde die Expression des GUS-Proteins nach der Transformation mit verschiedenen Heliumdrücken nachgewiesen. Zum Einsatz kamen „rupture discs“, die bei einem Druck von 600, 900, 1100 und 1350 zerbersten. Der GUS-Nachweis erfolgte nach 24 h Inkubation.

**Standardbedingungen:**

Rupture discs 900 psi

Heliumdruck 1100 psi

5,4 µl Gold-Suspension pro Schuß

Goldpartikel (Gold 0,6 µm)

Macrocarrier mit Gold/DNA befinden sich in der obersten Einschubebene.

Das pflanzliche Gewebe befindet sich in der 3. Einschubebene von oben.

Vakuum: 26-27 inches Hg

Blätter wurden einen Tag vor der Transformation mit der Blattunterseite nach oben in Gewebekulturschalen (9 cm) mit RMOP-Festmedium gelegt. Aus Protoplasten regenerierte Mikrokolonien wurden direkt vor dem Beschuss auf RMOP-Festmedium gelegt. Zur Regeneration stabiler Transformanten von Blättern und Mikrokolonien erfolgte nach zwei Tagen ein Transfer auf inhibitorhaltiges Medium. Von den Suspensionskulturen Arabidopsis und *rpo*-Tabak wurden 1 g bzw. 2 g eingewogen und direkt vor der Transformation in Gewebekulturschalen (9cm) auf RMOP-Festmedium ausgestrichen. Der Durchmesser der Kulturen wurde der Blattgröße von Tabakblättern angepasst und betrug ca. 4cm. Nach dem Beschuss wurden die Suspensionskulturen in Erlenmeyerkolben transferiert und für einen Tag ohne Hemmstoff kultiviert. Eine Woche nach Hemmstoffzugabe wurde das Frischgewicht der transformierten Suspensionskulturen im Vergleich zu der untransformierten Kontrolle bestimmt. Dies wurde nach der zweiten, dritten und teilweise auch vierten Woche wiederholt.

**2.10 Bestimmung der Selektionsbedingungen**

Die Selektionsbedingungen der zur Mitochondrien- und Plastidentransformation ausgewählten Inhibitoren mussten für die verwendeten Gewebe- und Pflanzenarten separat getestet werden.

**Inhibitor-Stammlösungen**

<b>Spectinomycin-Dihydrochlorid</b>	50 mg/ml
-------------------------------------	----------

bzw.

<b>Streptomycin-Sulfat</b>	50 mg/ml
----------------------------	----------

jeweils in H<sub>2</sub>O; filtersterilisiert; Lagerung bei -20°C

<b>Blasticidin S</b>	2 mg/ml
----------------------	---------

in H<sub>2</sub>O; filtersterilisiert; Lagerung bei -80°C

<b>Chloramphenicol</b>	5 mg/ml
------------------------	---------

in 100% Ethanol lösen, dann mit H<sub>2</sub>O auffüllen;

sterilfiltriert; Lagerung bei 4°C

**Hygromycin B** 5 mg/ml

in H<sub>2</sub>O; filtersterilisiert; Lagerung bei -20°C

**Antimycin A** 5 mg/ml

in 100% Ethanol; sterilfiltriert; Lagerung bei -20°C

**Myxothiazol** 5 mg/ml

in 100% Ethanol; sterilfiltriert; Lagerung bei -20°C

**Moa-Silbene** 10 mM

in 100% Ethanol; sterilfiltriert; Lagerung bei 4°C

**AEC** 500 mM

in H<sub>2</sub>O; filtersterilisiert; Lagerung bei -20°C

**n-Propyl-Gallat** 10 mM

in H<sub>2</sub>O; sterilfiltriert; Lagerung bei RT

Bei Testreihen, die zur Bestimmung der Selektionsbedingungen von Blattstücken dienten, wurden ca. 3 Wochen alte Blätter in 3-5 mm kleine Quadrate geschnitten, oder es wurden Blattstücke mit einem Korkbohrer (8 bzw. 10 mm Ø) ausgestanzt. Regeneriert wurden die Blattstücke 4-8 Wochen auf inhibitorhaltigem Festmedium. Protoplasten und die daraus regenerierten Mikrokolonien wurden bis zu 8 Wochen in Flüssig- oder Festmedium unter Zugabe von Hemmstoffen kultiviert. Die erste Hemmstoffzugabe erfolgte im 8.-16. Zellstadium, d.h. je nach Ausgangsmaterial 7-12 Tage nach der Protoplastierung. Der weitere Medienwechsel erfolgte in Abhängigkeit von der Stabilität der verwendeten Hemmstoffe (Tab.2.7).

**Tab. 2.7 Austausch der Regenerationsmedien in Abhängigkeit der eingesetzten Hemmstoffe**

	Blasticidin	Chloramphenicol	Hygromycin	Antimycin	Myxothiazol	Moa-Silbene	AEC
<b>Medienwechsel</b>	10-12 Tage	ca.21 Tage	8-10 Tage	7 Tage	7 Tage	8-10 Tage	10-12 Tage

Testreihen mit Suspensionskulturen wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben angesetzt. Die sterile Einwaage des Pflanzenmaterials betrug bei Arabidopsis 1g und bei *rpo*-Tabak 2g. Die Suspensionskulturen wurden eine Woche in der Dunkelkammer bei 25°C, 160 rpm mit jeweils 20 ml M<sub>4</sub>D-Suspensionsmedium geschüttelt. Nach der ersten, zweiten, dritten und zum Teil auch vierten Woche wurde der Zuwachs des Frischgewichts bei den einzelnen

Testreihen bestimmt. Nach jeder Woche wurde, wenn möglich, das gleiche Ausgangsgewicht von 1 bzw. 2 g neu eingewogen.

**Tab. 2.8 Testreihen pflanzlicher Gewebearten mit verschiedenen Hemmstoffen.**

Blast/Chl/Hyg entsprechen den auf den gesamten Stoffwechsel der Zelle wirkenden Antibiotika Blasticidin S, Chloramphenicol und Hygromycin B. Myx/Anti/Moa/nPG entsprechen den mitochondrialen Inhibitoren Myxothiazol, Antimycin A, Moa-Stilbenen und n-Propyl-Gallat. AEC (S-(2-aminoethyl) L-cystein) ist ein Lysin-Analoga und wird zur Selektion plastidärer Transformanten benutzt.

		Pflanzenarten		
		Tabak und <i>rpo</i> - Tabak	Kartoffel	Arabidopsis
Gewebeart	Blattstücke	Blast/Chl/Hyg/ Myx/Anti/Moa/AEC	AEC	
	Protoplasten / Mikrokolonien	Blast/Chl/Hyg/ Myx Moa/AEC/nPG	AEC	
	Suspensionskultur	Myx/Anti/Moa/ nPG		Myx/Anti/Moa/ nPG

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Stabile Transformation pflanzlicher Mitochondrien

In dieser Arbeit wurden zwei Strategien zur Transformation von Mitochondrien höherer Pflanzen entwickelt. Für den mitochondrienspezifischen Ansatz wurden insgesamt vier Transformationskassetten konstruiert, die sich durch Punktmutationen in unterschiedlichen Domänen des *cob*-Gens auszeichnen (siehe Kapitel 1.4 und Kapitel 2.4 Abb. 2.1 und 2.2). Diese Punktmutationen bewirken Resistenzen gegenüber den mitochondrialen Hemmstoffen Antimycin, Myxothiazol oder Moa-Stilben. Für die zweite Strategie wurde ein Markergen-Ansatz gewählt, der routinemäßig bei Plastidentransformationen sowie auch Kerntransformationen eingesetzt wird (siehe Kapitel 1.3). Bei ihm werden Markergene eingesetzt, die Resistenzen gegenüber Inhibitoren der Proteinbiosynthese vermitteln. Die verwendeten Transformationskassetten enthalten die Resistenzgene „*bsr*“, „*cat*“ oder „*hph*“, mitochondriale Regelelemente und flankierende mitochondriale Sequenzen (siehe Abb. 2.3 und 2.4). Neben einer geeigneten Strategie sind die Wahl der Transformationmethode, die Auswahl des Zielgewebes und die Bestimmung der Selektionsbedingungen wichtige Voraussetzungen für eine erfolgreiche Mitochondrientransformation.

#### 3.1.1 Bestimmung der Selektionsbedingungen

Die sehr guten Regenerationseigenschaften aus Blättern und Protoplasten von Tabak waren für die Etablierung der Plastidentransformation bei höheren Pflanzen ein entscheidender Faktor. Andere Pflanzenarten wie Arabidopsis, Tomate oder Kartoffel besitzen im Vergleich dazu deutlich schlechtere Regenerationseigenschaften. Aus diesem Grund wurde Tabak als Zielpflanze ausgewählt. Für die Markergen-Strategie wurden Blätter und Protoplasten als Zielgewebe verwendet. Bei der mitochondrienspezifischen Strategie wurden als alternative Zielgewebe neben Zellen von *Nicotiana tabacum* plastidäre Tabak-, 'knock-out'-Mutanten (*rpo*-Mutanten) verwendet, die Deletionen in den Genen *rpo A*, *B* und *C1* besitzen und somit keine plastidäre RNA-Polymerase synthetisieren können. Des Weiteren wurden Arabidopsis-Suspensionskulturen verwendet. Bei allen Zell- bzw. Gewebearten wurden die Selektionsbedingungen mit den jeweiligen Hemmstoffen getestet.

##### 3.1.1.1 Selektionsbedingungen bei Blattstücken

Zur Bestimmung der Selektionsbedingungen von Blattstücken wurden ca. 3 Wochen alte WT-Tabak-Blätter in 3-5 mm kleine Quadrate geschnitten, oder es wurden Blattstücke mit einem Korkbohrer (8 bzw. 10 mm Ø) ausgestanzt.

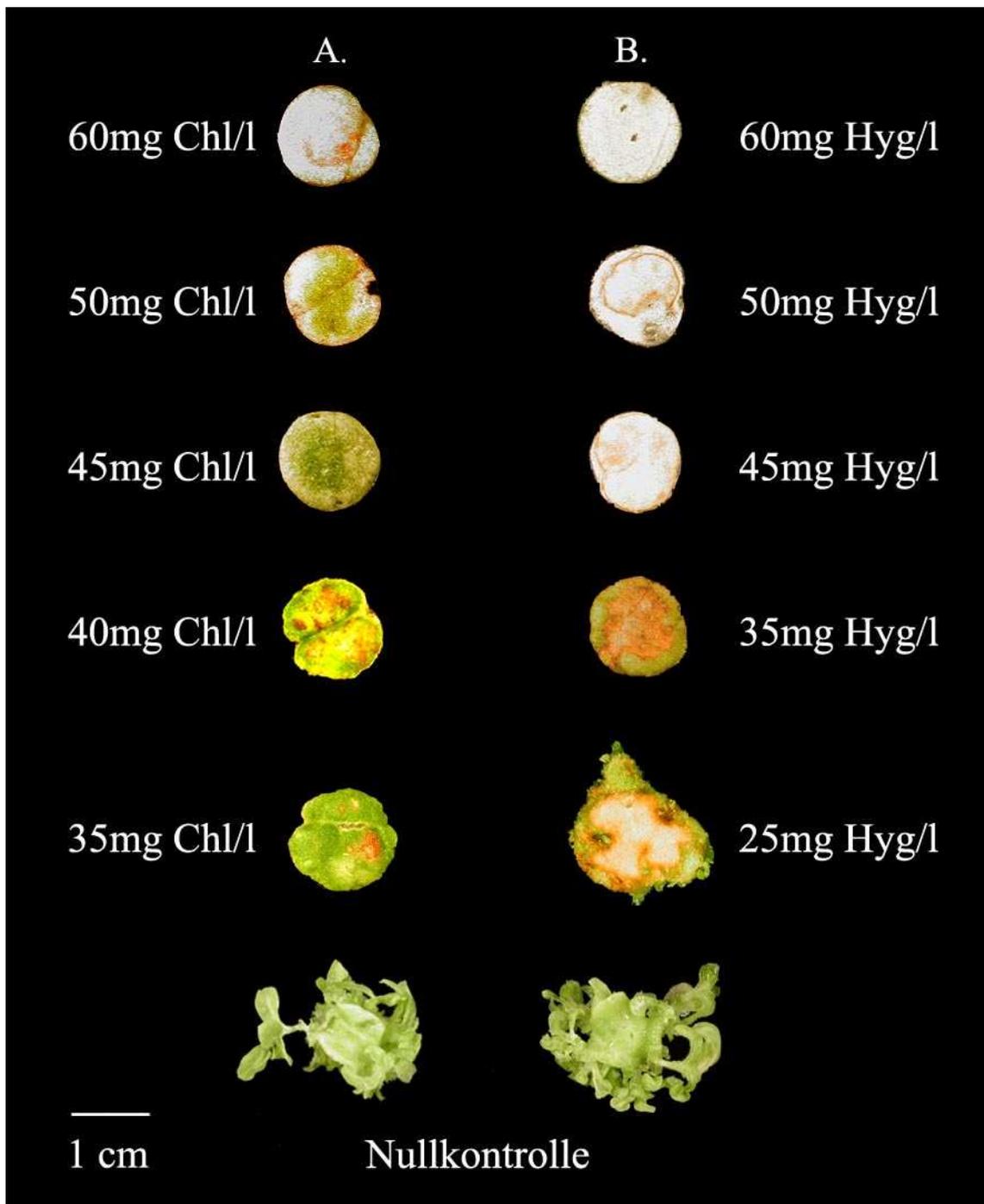
### 3.1.1.1.1 Testreihen mit dem Hemmstoff Blastocidin bei Blattstücken

Zur Selektion geeigneter Blastocidin-Konzentrationen während der Regeneration von mitochondrialen Transformanten wurden Testreihen mit Blastocidin-Konzentrationen von 0-6 mg/l (0/0,5/1/1,5/2/2,5/3/3,2/4/5/6 mg/l) durchgeführt. Die Auswertung der Testreihen erfolgte nach einer bzw. nach drei Wochen auf selektivem Medium. Nach einer Woche konnten bei Konzentrationen von 4,0, 5,0 und 6,0 mg/l nur weiße abgestorbene Blattstücke beobachtet werden. Bei Konzentrationen zwischen 2,0 und 3,2 mg/l zeigten jeweils 27% der Blattstücke noch grüne Bereiche, hauptsächlich an hervorstehenden Blatträndern, die zum Teil nicht vollständig mit dem Medium in Kontakt waren. Nach drei Wochen entwickelte sich bei Blastocidin-Konzentrationen zwischen 2,0 und 3,2 mg/l an den grünen Bereichen ein starkes Kalluswachstum mit vereinzelter Sprossbildung. Die Blattstücke der Null-Kontrolle vergrößerten sich innerhalb von 3 Wochen um das 3-4fache. Um eine bessere Penetration von Blastocidin in das Blattgewebe zu gewährleisten, wurde eine Testreihe in Flüssigkultur durchgeführt. Bei Konzentrationen zwischen 2,0 und 6,0 mg/l sind die Blattstücke innerhalb der ersten 10 Tage abgestorben. Bei 1,5mg/l waren bereits 15% der Blattstücke nach einer Woche abgestorben, die restlichen Blattstücke waren gewölbt und wiesen weiße Bereiche auf. Bei 1,0 und 0,5 mg/l waren die Blattstücke ebenfalls gewölbt und zeigten eine blassgrüne Farbe. Weiße Bereiche wurden nicht identifiziert. Eine leichte Zunahme in der Größe im Vergleich zur Anfangsgröße konnte nur bei Blastocidin-Konzentrationen von 0,5 mg/l oder niedriger beobachtet werden. Vergleichbar der Testreihe mit Festmedium, zeigten die Blattstücke der 0-Kontrolle eine Vergrößerung um das 3-4fache. Geeigneten Bedingungen zur Selektion von Mitochondrientransformanten konnten somit nicht ermittelt werden.

### 3.1.1.1.2 Testreihen mit dem Hemmstoff Chloramphenicol bei Blattstücken

In den Testreihen mit Chloramphenicol als Hemmstoff wurde bei Tabak ein Konzentrationsbereich von 35-60 mg/l gewählt (Abb. 3.1A). Für jede Hemmstoff-Konzentration wurden vier Blattstücke mit einem 10 mm Ø Korkbohrer ausgestanzt und auf RMOP-Regenerationsmedium aufgelegt. Die Testreihen mit Chloramphenicol als selektivem Hemmstoff zeigten bei Blattstücken ein breites Selektionsfenster (Abb. 3.1). Ein breites Selektionsfenster bedeutet, dass die Wirkung des Hemmstoffs sich in einem Konzentrationsbereich von 35-45 mg/l Chloramphenicol bewegt. Bei Chloramphenicol-Konzentrationen von 35-60 mg/l sind deutliche Unterschiede in der Regenerationsfähigkeit festzustellen. Bei allen Konzentrationen ist anfänglich eine blassgrüne Verfärbung der Blattstücke zu beobachten. Mit steigender Chloramphenicol-Konzentration kommt es zu

gelblichen, später zu weißen Verfärbungen hauptsächlich an den Blatträndern. Ab Konzentrationen von 50mg/l ist eine Ausdehnung der weißen Bereiche auf das gesamte Blattstück zu beobachten. Bei Chloramphenicol-Konzentrationen ab 60mg/l sterben die Blattstücke innerhalb von 4 Wochen ab. Bis zu Konzentrationen um 45mg/l Chloramphenicol erfolgt ab der 6. Woche ein schwaches Kalluswachstum. Nach ca. 6-8 Wochen setzt Sprossbildung bei Chloramphenicol-Konzentrationen bis 45 mg/l ein. Für die Versuche zur Selektion von Mitochondrientransformanten wurde ein Konzentrationsbereich von 35-45mg/l Chloramphenicol gewählt.



**Abb. 3.1 Wirkung von Chloramphenicol und Hygromycin auf das Wachstum von Tabakblattstücken.** Tabakblattstücke wurden mit einem 10 mm Ø Korkbohrer ausgestochen und auf RMOP-Regenerationsmedium mit unterschiedlichen Chloramphenicol- bzw. Hygromycin-Konzentrationen ausgelegt. Nach einer Regenerationzeit von 4 Wochen wurde die Hemmwirkung dokumentiert.

### 3.1.1.1.3 Testreihen mit dem Hemmstoff Hygromycin bei Blattstücken

Der Konzentrationsbereich für Testreihen mit dem Antibiotikum Hygromycin zur Selektion während der Regeneration von Blattstücken lag zwischen 25 und 60 mg/l (0/25/30/35/40/45/50/60 mg/l). Für jede Hygromycin-Konzentration wurden analog zur Chloramphenicol-Testreihe vier Blattstücke mit einem 10 mm Ø Korkbohrer ausgestanzt und auf RMOP-Regenerationsmedium aufgelegt. Um möglichst nahe an den „Particle gun“-Transformationsbedingungen zu sein, wurden zusätzlich ca. 3-4 Tabak-Blätter in 3-5 mm kleine Quadrate geschnitten und ebenfalls auf hygromycinhaltigem Regenerationsmedium ausgelegt. Somit wurden pro Hemmstoff-Konzentration die Regenerationseigenschaften bei ca. 30 Blattstücken getestet. Nach einer Woche auf selektivem Medium waren bei einer Konzentration von 60 mg/l alle Blattstücke abgestorben, bei 45 mg/l 86%, bei 35 mg/l 46% und bei 25 mg/l 15%. Die noch lebenden Blattstücke zeigten konzentrationsabhängig blassgrüne Bereiche an den Blatträndern und in der Blattmitte teilweise weiße Bereiche. Nach 4 Wochen (siehe Abb. 3.1B) waren alle Blattstücke, die auf einer Hygromycin-Konzentration von 45 mg/l ausgelegt waren, abgestorben. Bei einer Konzentration von 35 mg/l sind im weiteren Verlauf keine weiteren Blattstücke abgestorben. Die Blattränder waren meist blassgrün mit leichter Kallusbildung. Die Blattmitte zeigte braune oder weiße Bereiche. Bei 25 mg/l konnte man an den Blatträndern zusätzlich zur Kallusbildung Sprosswachstum beobachten. Als optimale Konzentration zur Selektion von Mitochondrientransformanten wurde 35mg/l Hygromycin gewählt. Nach den ersten Transformationsexperimenten stellte sich jedoch heraus, dass die gewählte Konzentration zu niedrig war. Nach ca. 4-5 Wochen zeigte sich bei allen zur Transformation benutzten Blattstücken an den Blatträndern eine starke Sprossbildung. Eine Unterscheidung von Transformanten von „falsch Positiven“ war somit nicht möglich. Eine stufenweise Anhebung der Hygromycin-Konzentration auf 45 mg/l, 50 mg/l und 55 mg/l zum routinemäßigen Medienwechsel nach jeweils 8-10 Tagen konnte den nötigen Selektionsdruck gewährleisten.

### 3.1.1.1.4 Testreihen mit dem Hemmstoff Antimycin bei Blattstücken

Um die Regenerationseigenschaften von Tabak- und *rpo*-Tabakblattstücken unter Einwirkung des Atmungsketten-Inhibitors Antimycin zu testen, wurde ein Konzentrationsbereich von 0-20mg/l (0/2/5/10/20 mg/l) Antimycin gewählt. In Tab. 3.1 und 3.2 sind die Blattgewichte der

Testreihen unter Einfluss von Antimycin dargestellt. Die Regenerationsfähigkeit wurde unter Einfluss des Hemmstoffs über einen Zeitraum von 4 Wochen untersucht. Für jede Hemmstoff-Konzentration wurden 8 Blattstücke mit einem 10 mm Ø Korkbohrer ausgestanzt und auf RMOP-Regenerationsmedium aufgelegt. Die Blattstücke aller Konzentrationsbereiche zeigten bei Tabak eine kräftige grüne Farbe und waren vergleichbar mit der 0-Kontrolle. Bei Testreihen mit *rpo*-Tabakblattstücken zeigte sich bei allen Konzentrationsbereichen kein Unterschied zur 0-Kontrolle. Unterschiede im Habitus oder der Wuchsform konnten im Vergleich zur 0-Kontrolle weder bei Tabak noch bei *rpo*-Tabak beobachtet werden. In der Tendenz ist zwar ein Abnehmen der Blattgewichte bei zunehmender Antimycin-Konzentration zu beobachten, eine statistische Absicherung der Daten ist aber nicht gegeben. Sowohl für Tabak als auch für *rpo*-Tabakblattstücke konnte keine zur Selektion von Mitochondrientransformanten geeignete Antimycin-Konzentration ermittelt werden. Durch die schlechte Penetration von Antimycin in das Blattgewebe war es nicht möglich, einen ausreichenden Selektionsdruck aufzubauen.

**Tab. 3.1 Regeneration von Tabakblattstücken unter dem Einfluss von Antimycin**

	Blattgewicht nach 4 Wochen in g			
<b>0-Kontrolle</b>	3,18	2,84	2,94	2,76
<b>2mg/l Antimycin</b>	3,03	1,94	2,72	1,72
<b>5mg/l Antimycin</b>	3,16	1,97	2,61	1,53
<b>10mg/l Antimycin</b>	1,73	1,25	1,9	2,54
<b>20mg/l Antimycin</b>	1,82	1,42	2,49	2,33

**Tab. 3.2** Regeneration von *rpo*-Tabakblattstücken unter dem Einfluss von Antimycin

	Blattgewicht nach 4 Wochen in g			
<b>0-Kontrolle</b>	1,83	2,03	1,49	1,97
<b>2mg/l Antimycin</b>	2,52	0,93	1,39	1,76
<b>5mg/l Antimycin</b>	1,86	0,83	1,69	1,08
<b>10mg/l Antimycin</b>	1,16	1,16	1,54	1,03
<b>20mg/l Antimycin</b>	0,85	0,86	1,51	0,79

### 3.1.1.1.5 Testreihen mit dem Hemmstoff Myxothiazol bei Blattstücken

Bei Testreihen zu den Regenerationseigenschaften von Tabak- und *rpo*-Tabakblattstücken unter Einwirkung von Myxothiazol wurden die gleichen Parameter verwendet wie bei den Testreihen mit dem Hemmstoff Antimycin. In Tab. 3.3 und 3.4 sind die Blattgewichte der Testreihen unter Einfluss von Myxothiazol nach einer Regenerationszeit von 4 Wochen dargestellt. Mit ansteigender Myxothiazol-Konzentration konnte eine verringerte Sprossbildung und eine schlechtere Regenerationsfähigkeit beobachtet werden. Bei Konzentrationen von 0-10 mg/l Myxothiazol waren keine Unterschiede in der Wuchsform, dem Habitus oder der Farbe gegenüber der 0-Kontrolle vorhanden. Bei der höchsten Myxothiazol-Konzentration von 20 mg/l waren an direkten Kontaktstellen zwischen den Blattstücken und dem Regenerationsmedium kleine braune Bereiche im Pflanzengewebe zu beobachten. Ein ausreichender Selektionsdruck zur Selektion von Mitochondrien-transformanten konnten nicht erreicht werden.

**Tab. 3.3** Regeneration von Tabakblattstücken unter dem Einfluss von Myxothiazol

	Blattgewicht nach 4 Wochen in g			
<b>0-Kontrolle</b>	3,18	2,84	2,94	2,76
<b>2mg/l Myxothiazol</b>	2,08	2,77	3,07	3,14
<b>5mg/l Myxothiazol</b>	2,17	2,83	2,46	1,87
<b>10mg/l Myxothiazol</b>	2,08	1,64	2,51	2,29
<b>20mg/l Myxothiazol</b>	1,58	2,4	1,94	1,71

**Tab. 3.4** Regeneration von *rpo*-Tabakblattstücken unter dem Einfluss von Myxothiazol

	Blattgewicht nach 4 Wochen in g			
<b>0-Kontrolle</b>	1,83	2,03	1,49	1,97
<b>2mg/l Myxothiazol</b>	2,11	1,84	2,43	2,59
<b>5mg/l Myxothiazol</b>	1,99	2,28	2,62	1,83
<b>10mg/l Myxothiazol</b>	1,45	1,66	1,32	1,99
<b>20mg/l Myxothiazol</b>	1,37	1,08	1,85	1,61

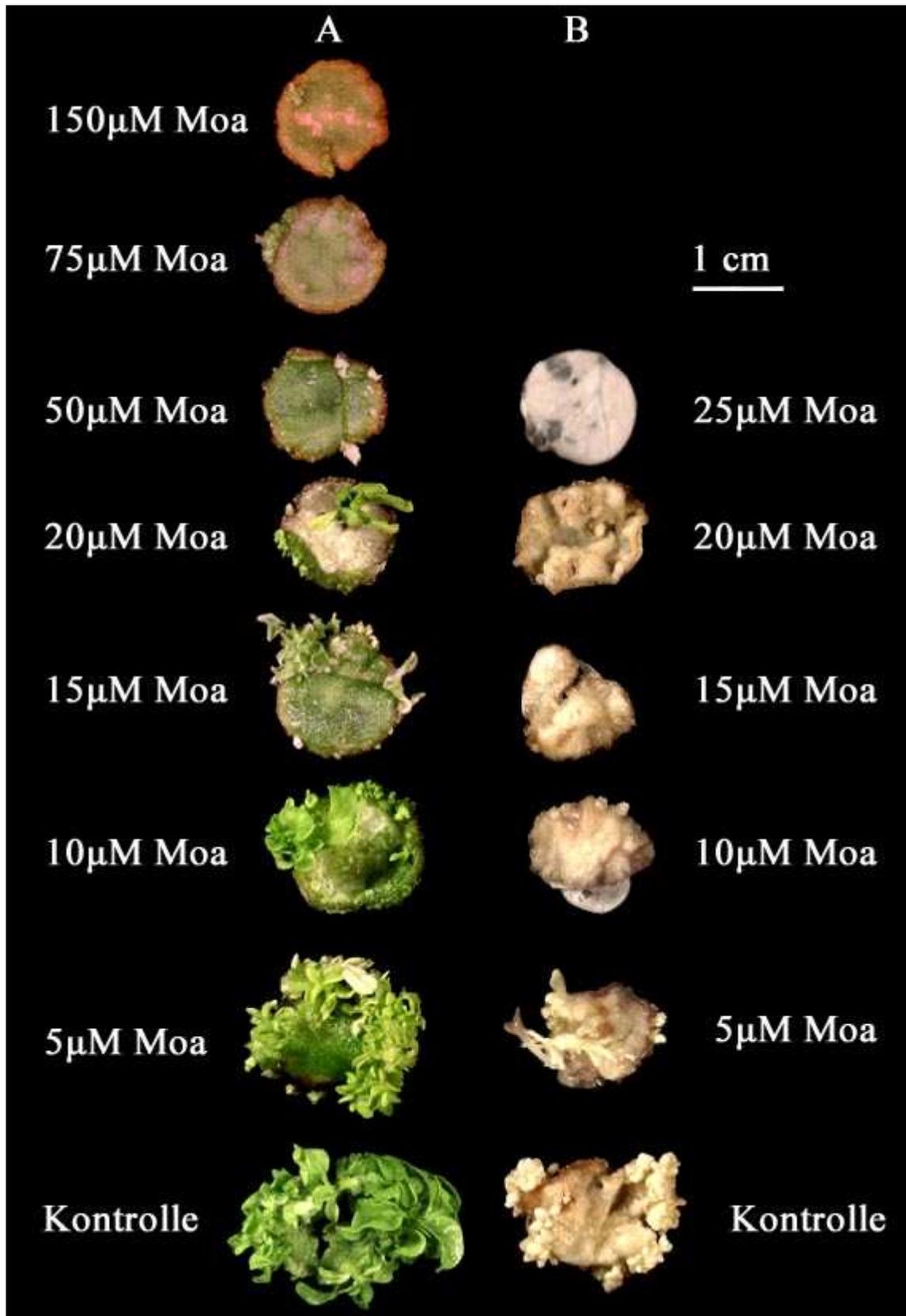
### 3.1.1.1.6 Testreihen mit dem Hemmstoff Moa-Stilben bei Blattstücken

In den Testreihen mit Moa-Stilben als Hemmstoff wurde bei Tabak ein Konzentrationsbereich von 5-150  $\mu\text{M}$  und bei *rpo*-Tabak von 5-25  $\mu\text{M}$  gewählt (Abb. 3.2A). Bis zu Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  war bei Tabak eine starke Sprossregeneration zu beobachten. Die Blattstücke bildeten nur wenig Kallus. Mit steigender Moa-Stilben-Konzentration wurde die Sprossregeneration zunehmend geringer. Die Blattstücke waren blassgrün und an den Rändern bräunlich. Teilweise waren weiße abgestorbene Bereiche in der Blattmitte zu erkennen. Oft bildeten sich nur weiße Sprossansätze, die vermehrt an den Blatträndern auftraten. Zur Selektion von mitochondrialen Transformanten wurden Moa-Stilben-Konzentrationen von 25-50  $\mu\text{M}$  ausgewählt.

Bei *rpo*-Tabakblattstücken zeigt sich bereits bei geringeren Moa-Stilbenkonzentrationen eine Hemmwirkung (Abb. 3.2B). Bei Konzentrationen um 10  $\mu\text{M}$  ist ein leichtes Sprosswachstum zu beobachten. Im Gegensatz zu der WT-Tabaktestreihe ist das Kalluswachstum stärker ausgeprägt. Die Blattstücke sind bis Konzentrationen von 20  $\mu\text{M}$  verdickt und spröde. Bei höheren Moa-Stilben-Konzentrationen sterben die Blattstücke innerhalb der ersten 10 Tage. Für die Selektion der potentiellen Transformanten wurden Konzentrationen zwischen 10 und 20  $\mu\text{M}$  Moa-Stilben gewählt.

---

**Abb. 3.2 Wirkung von Moa-Stilben auf das Wachstum von Tabakblattstücken.** Wirkung von Moa-Stilben auf die Regeneration von Tabakblattstücken (A) und *rpo*-Tabakblattstücken (B). Tabakblattstücke wurden mit einem 10 mm Korkbohrer ausgestanzt und auf RMOP-Medium mit unterschiedlichen Moa-Stilben-Konzentrationen aufgelegt. Nach einer Regenerationszeit von 5 Wochen wurde die Hemmwirkung dokumentiert.



### **3.1.1.2 Selektionsbedingungen bei Protoplasten/Mikrokolonien**

Bei allen Testreihen mit Protoplasten erfolgte die erste Hemmstoffzugabe, nachdem sich Mikrokolonien im 8-16 Zellstadium gebildet hatten. Das entsprach je nach Ausgangsmaterial nach 7-12 Tagen Regeneration im Flüssigmedium.

#### **3.1.1.2.1 Mikrokolonietestreihen mit dem Hemmstoff Blasticidin**

Um eine bessere Penetration von Blasticidin in das Pflanzengewebe zu erreichen, wurden bei den Blasticidin-Testreihen Netze mit eingebetteten Protoplasten zum einen auf selektivem Festmedium und zum anderen in selektivem Flüssigmedium regeneriert. Für jede Konzentration wurden drei Wiederholungen durchgeführt. Auf Festmedium konnte bei einer Hemmstoffkonzentration von 0,5 mg/l nach einer Woche kein Unterschied in der Regenerationsfähigkeit und Dichte der Kolonien im Vergleich zur 0-Kontrolle festgestellt werden. Bei Blasticidin-Konzentrationen von 1,0, 1,5, 2,0 und 2,5 mg/l konnte eine geringere Zunahme der Zelldichte im Vergleich zur 0-Kontrolle beobachtet werden. Nach drei Wochen unter selektiven Bedingungen waren bei den Blasticidin-Konzentrationen 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 mg/l jedoch keine Unterschiede in der Regenerationsfähigkeit und Dichte der Kolonien zu beobachten. In Flüssigkultur war im Vergleich zur 0-Kontrolle nach der ersten Woche unter selektiven Bedingungen bei allen Konzentrationen eine deutlich Hemmung in der Regenerationsfähigkeit der Kolonien festzustellen. Die Teilungsrates der Zellen war deutlich geringer als bei der 0-Kontrolle, die Anzahl an abgestorbenen Protoplasten höher. Nach drei Wochen unter selektiven Bedingungen konnten jedoch vergleichbar der Protoplasten-Testreihe in Festmedium keine Unterschiede in der Regenerationsfähigkeit und Dichte der Kolonien bei den Blasticidin-Konzentrationen 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 mg/l festgestellt werden. Damit konnten, ähnlich wie bei Blattstücken, keine geeigneten Selektionsbedingungen erzielt werden. Offenbar werden die Pflanzenzellen, die über keinen direkten Kontakt mit dem blasticidinhaltigen Regenerationsmedium verfügen, nicht genügend gehemmt. Höhere, als die hier gewählten Blasticidin-Konzentrationen führen zu einem kompletten Absterben der Zellen innerhalb der ersten Woche auf selektivem Regenerationsmedium. In Vorversuchen wurden entsprechende Testreihen mit Blasticidin-Konzentrationen bis zu 6 mg/l durchgeführt.

#### **3.1.1.2.2 Mikrokolonietestreihen mit dem Hemmstoff Chloramphenicol**

Der Konzentrationsbereich für Testreihen von aus Protoplasten regenerierten Zellkolonien mit Chloramphenicol als selektivem Hemmstoff wurde von 30-60 mg/l (30/35/40/45/50/60 mg/l) gewählt. Nach einer Regenerationszeit von 2 Wochen waren bei Konzentrationen von 30-50 mg/l alle Kolonien weiß. Die Dichte und Regenerationsfähigkeit dieser Kolonien war

gegenüber der 0-Kontrolle deutlich verringert. Bei einer Konzentration von 60mg/l wurden nur abgestorbene Zellen beobachtet. Nach einer Regenerationszeit von 4-5 Wochen konnte bei den verbliebenen Testreihen (30-50 mg/l Chloramphenicol) Kallusbildung beobachtet werden. Eine Sprossbildung zeigte sich vereinzelt nach 8 Wochen, unabhängig von der Chloramphenicol-Konzentration. Es war somit nicht möglich geeignete Bedingungen für eine Selektion von Mitochondrientransformanten aus Protoplasten mit dem Antibiotikum Chloramphenicol zu erzielen.

#### **3.1.1.2.3 Mikrokolonietestreihen mit dem Hemmstoff Hygromycin**

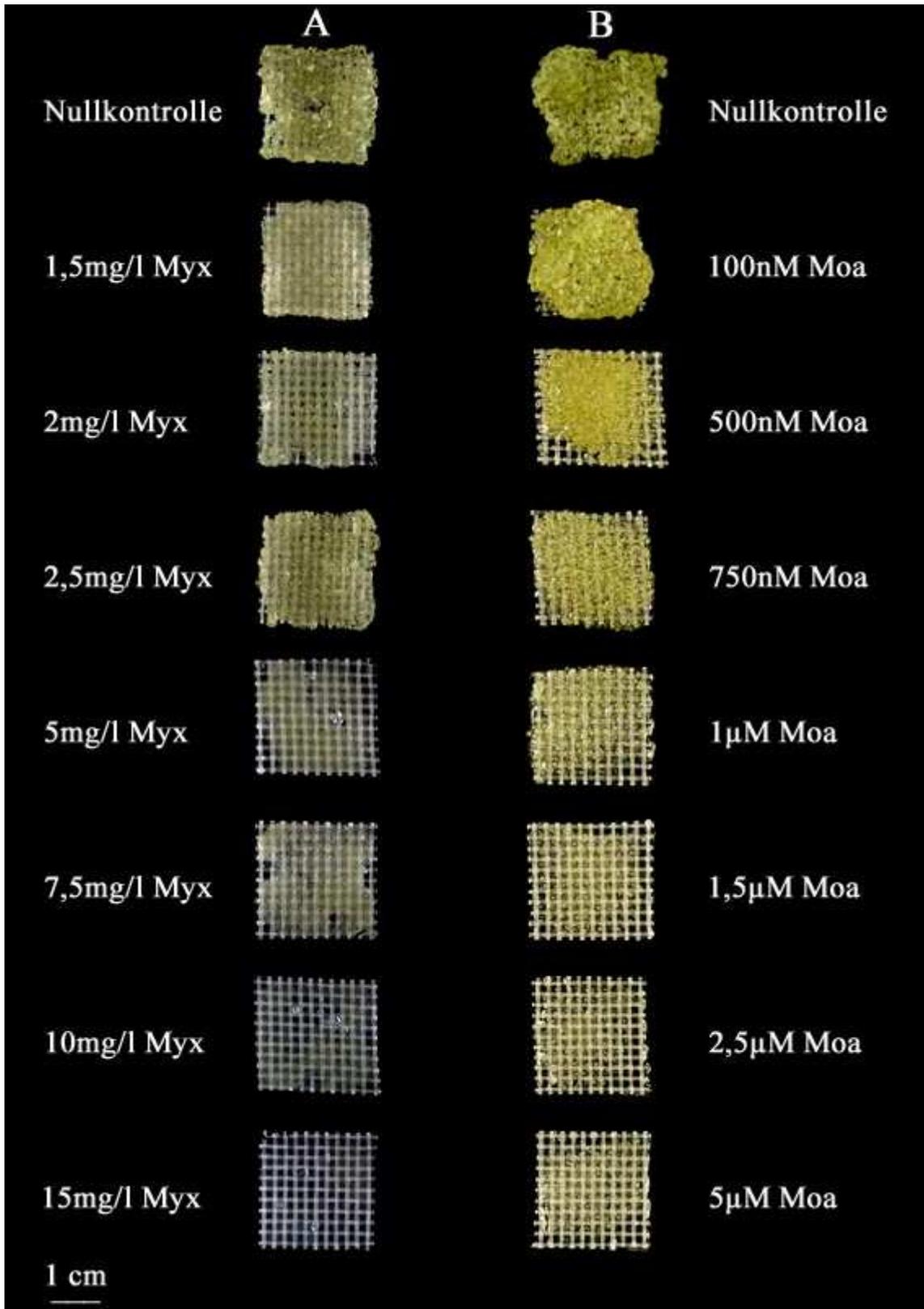
Für Testreihen von aus Protoplasten regenerierten Zellkolonien mit Hygromycin als selektivem Hemmstoff wurde ein Konzentrationsbereich von 25-50 mg/l (25/30/35/40/45/50 mg/l) gewählt. Nach einer Regenerationszeit von fünf Wochen konnte bis Konzentrationen von 35 mg/l Kalluswachstum beobachtet werden. Im Vergleich zur 0-Kontrolle war die Entwicklung dieser Kolonien deutlich reduziert und gekennzeichnet von einer weiß-grünlischen Farbe. Ab Konzentrationen von 40 mg/l waren alle Zellkolonien abgestorben. Eine Sprossbildung konnte bei keiner der Testreihen beobachtet werden. In Versuchen zur Selektion von potentiellen mitochondrialen Transformanten wurden zu Beginn der Selektion 20 mg/l, nach 8-10 Tagen 25 mg/l und nach weiteren 8-10 Tagen 30 mg/l Hygromycin eingesetzt.

#### **3.1.1.2.4 Mikrokolonietestreihen mit dem Hemmstoff Antimycin**

Die Regenerationseigenschaften von Protoplasten unter Einwirkung von Antimycin wurde bereits in der Diplomarbeit von S. Klaus in dieser Arbeitsgruppe dokumentiert. Als Anfangskonzentration zur Selektion von mitochondrialen Transformanten wurden 3 mg/l Antimycin verwendet. Nach 14 Tagen wurde auf 5 mg/l und nach weiteren 14 Tagen auf 10 mg/l erhöht.

#### **3.1.1.2.5 Mikrokolonietestreihen mit dem Hemmstoff Myxothiazol**

Zur Charakterisierung von aus Protoplasten regenerierten Zellkolonien unter Einwirkung von Myxothiazol wurde ein Konzentrationsbereich von 1,5-15 mg/l Myxothiazol ausgewählt (Abb 3.3A). Nach 3-wöchiger Regenerationszeit war bei allen Kolonien eine blasse weiß-grüne Verfärbung zu beobachten. Ab 3-5 mg/l war eine deutliche Abnahme in der Zelldichte gegenüber der 0-Kontrolle zu beobachten. Ab ca. 15 mg/l kommt es zum Absterben der Mikrokolonien. Die Selektion von Transformanten wurde mit 3 mg/l begonnen, nach 14 Tagen auf 5 mg/l und nach weiteren 14 Tagen auf 10 mg/l Myxothiazol erhöht.



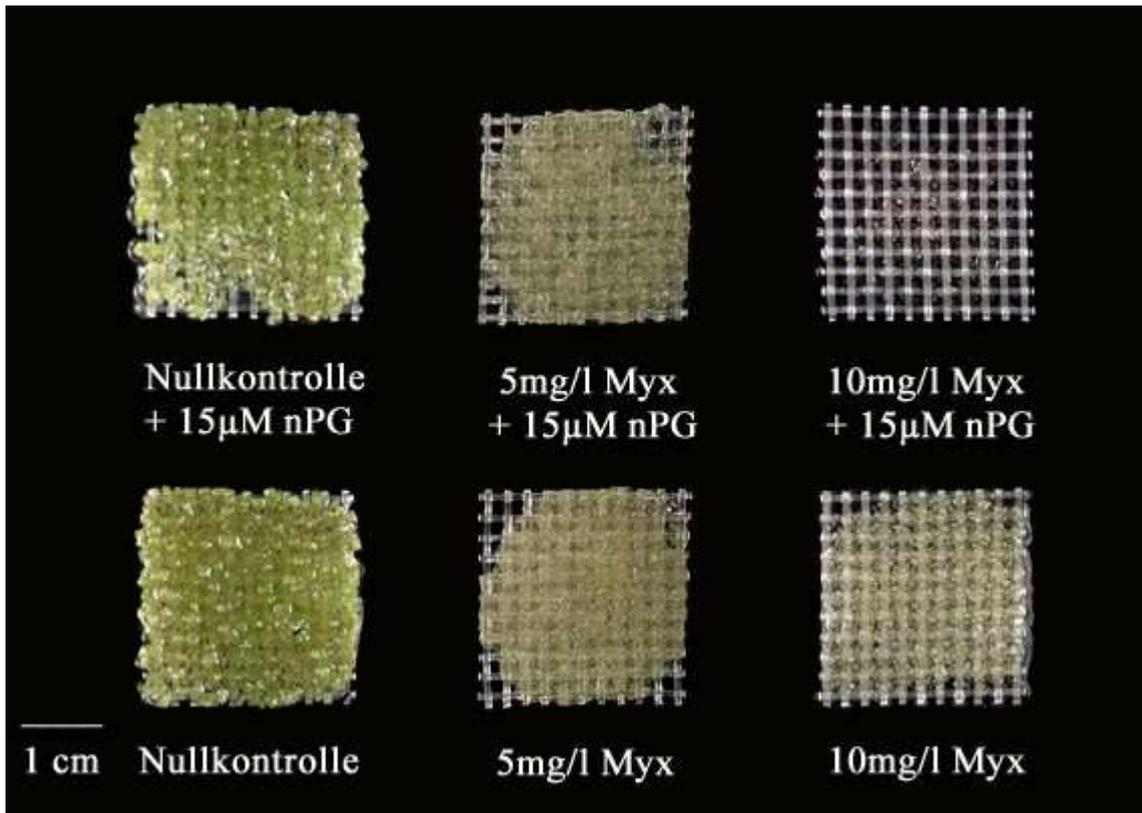
**Abb. 3.3 Wirkung von Myxothiazol und Moa-Stilben auf die Regeneration von Tabakprotoplasten.** Isolierte Tabakprotoplasten wurden in Alginatnetzen eingebettet und in flüssigem Regenerationsmedium (F-PCN) mit unterschiedlichen Konzentrationen Myxothiazol (A) bzw. Moa-Stilben (B) kultiviert. Nach einer Regenerationszeit von 21 Tagen (Myxothiazol-Testreihe) und 28 Tagen (Moa-Stilben-Testreihe) wurde die Hemmwirkung dokumentiert.

### 3.1.1.2.5 Mikrokolonieteststreifen mit dem Hemmstoff Moa-Stilben

Bei von aus Protoplasten regenerierten Zellkolonien mit Moa-Stilben als selektivem Hemmstoff wurde ein Konzentrationsbereich von 100 nM-5  $\mu$ M gewählt (Abb. 3.3B). Im Vergleich zur Antimycin- und Myxothiazoltestreihe war nur eine geringe blassgrüne Verfärbung der Kolonien ab Konzentrationen von 1  $\mu$ M zu beobachten. Die Regenerationsfähigkeit und Zelldichte nahm bereits ab ca. 100 nM mit zunehmender Moa-Stilbenkonzentration stetig ab. Selektiert wurden die potentiellen Transformanten mit 2-5  $\mu$ M Moa-Stilben.

### 3.1.1.2.5 Mikrokolonieteststreifen mit dem Hemmstoff n-Propyl-Gallat

Die zur Selektion von Transformanten notwendigen Konzentrationen der mitochondrialen Inhibitoren Antimycin, Myxothiazol und Moa-Stilben wurden so gewählt, dass die Regenerationsfähigkeit gegenüber der 0-Kontrolle stark reduziert war, ein Absterben der Kolonien aber vermieden wurde. Um den Selektionsdruck zu erhöhen wurden Testreihen mit dem Hemmstoff n-Propyl-Gallat (npG) durchgeführt. npG bindet an die alternative Oxidase und hemmt den Transport der Elektronen aus dem Ubichinonpool zum Sauerstoff. Damit wird der alternative Weg der Elektronenübertragung in der Atmungskette unterbrochen. In der Diplomarbeit von S. Klaus wurde bereits eine selektive npG-Konzentration von 15  $\mu$ M in Kombination mit dem Hemmstoff Antimycin ermittelt. In den durchgeführten Testreihen wurde deutlich, dass bei npG-Konzentrationen bis 20  $\mu$ M keine oder nur eine geringfügige Hemmung in der Regenerationsfähigkeit zu erkennen war, wenn npG als alleiniger Hemmstoff eingesetzt wurde. Bei steigender Konzentration der Inhibitoren Antimycin, Myxothiazol oder Methoxyacrylat-Inhibitoren wie z.B. Moa-Stilben (d.h. der normale Weg des Elektronentransportes von Cytochrom *b* zu Cytochrom *c*<sub>1</sub> im Komplex III der mitochondrialen Atmungskette wird zunehmend gehemmt) zeigt sich, dass ab einer npG-Konzentration von 15  $\mu$ M der alternative Weg der Elektronenübertragung vermutlich unterbrochen wird. In Abb. 3.4 ist als Beispiel die Regeneration von Tabakprotoplasten unter Einwirkung von npG und Myxothiazol dargestellt.



**Abb. 3.4 Regeneration von Tabakprotoplasten unter Einfluss von Myxothiazol (Myx) und n-Propyl-Gallat (nPG).** Isolierte Tabakprotoplasten wurden in Alginatnetze eingebettet und in flüssigem Regenerationsmedium (F-PCN) mit unterschiedlichen Konzentrationen Myxothiazol kultiviert. Zusätzlich wurde Wirkung von nPG (hemmt die Funktion der alternativen Oxidase) auf die Regenerationsfähigkeit untersucht. Nach einer Regenerationszeit von 33 Tagen wurde die Hemmwirkung dokumentiert.

### 3.1.1.3 Selektionsbedingungen bei Suspensionskulturen

Als alternatives Zielgewebe zur Mitochondrientransformation wurden Suspensionskulturen von *rpo*-Tabak und Arabidopsis verwendet. Suspensionskulturen von Tabak wurden aufgrund der geringeren Wachstumsrate gegenüber *rpo*-Tabak nicht verwendet. Bei *rpo*-Tabak- und Arabidopsis-Suspensionen wurden die Regenerationseigenschaften unter Einwirkung der mitochondrienspezifischen Hemmstoffe Antimycin, Myxothiazol und Moa-Stilben getestet. Zusätzlich wurde die Wirkung von nPG auf die Regenerationsfähigkeit untersucht. Die Dauer der Testreihen betrug 3-4 Wochen. Zu jeder Konzentration wurden 3 Wiederholungen durchgeführt. Die Daten in den Diagrammen und Tabellen repräsentieren den Mittelwert der Wiederholungen. Jeweils wöchentlich wurde das Frischgewicht bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit ist in den Diagrammen das Frischgewicht nach einer Regenerationszeit von einer Woche dargestellt. Bei den Hemmstofftestreihen mit *rpo*-Tabak-Suspensionskulturen war nach einer Woche eine stärkere Wachstumshemmung mit den Hemmstoffen Myxothiazol und Antimycin festzustellen, als nach zwei bzw. nach drei Wochen. Bei der Arabidopsis-Testreihe mit dem Hemmstoffe Myxothiazol zeigte sich der gleiche Effekt. Die Testreihen

mit dem Hemmstoff Moa-Stilben zeigten dagegen keine oder nur eine geringe Veränderung in der Gewichtszunahme während der 3-4wöchigen Testphase. Die Daten der Moa-Stilben-Testreihe bei Arabidopsis-Suspensionskulturen konnten nicht gezeigt werden. Bei der Arabidopsis-Testreihe mit dem Hemmstoff Antimycin war ein entgegengesetzter Effekt festzustellen. Mit zunehmender Versuchsdauer sank der Zuwachs an Frischgewicht bei allen verwendeten Antimycin-Konzentrationen. In den Tabellen 3.5 und 3.6 sind die wöchentlichen prozentualen Frischgewichtszunahmen von *rpo*-Tabak- und Arabidopsis-Suspensionskulturen bei unterschiedlichen Konzentrationen der Hemmstoffe Myxothiazol, Antimycin und Moa-Stilben dargestellt.

**Tab. 3.5 Wachstum von *rpo*-Tabak-Suspensionkulturen unter dem Einfluss der Hemmstoffe Myxothiazol, Antimycin und Moa-Stilben.**

		Gewichtszunahme nach der ersten Woche (Fw)	Gewichtszunahme nach der zweiten Woche (Fw)	Gewichtszunahme nach der dritten Woche (Fw)
<b>Myxothiazol</b>	<b>5 mg/l</b>	25%	-4%	24%
	<b>2 mg/l</b>	73%	73%	164%
	<b>1 mg/l</b>	119%	147%	139%
	<b>0 mg/l</b>	294%	256%	383%
<b>Antimycin</b>	<b>5 mg/l</b>	28%	50%	21%
	<b>2 mg/l</b>	59%	133%	107%
	<b>1 mg/l</b>	70%	212%	155%
	<b>0 mg/l</b>	473%	465%	550%
<b>Moa-Stilben</b>	<b>10 µM</b>	24%	27%	28%
	<b>5 µM</b>	44%	48%	43%
	<b>1 µM</b>	256%	411%	285%
	<b>0 µM</b>	445%	431%	480%

**Tab. 3.6 Wachstum von Arabidopsis-Suspensionkulturen unter dem Einfluss der Hemmstoffe Myxothiazol und Antimycin**

		Gewichtszunahme nach der ersten Woche (Fw)	Gewichtszunahme nach der zweiten Woche (Fw)	Gewichtszunahme nach der dritten Woche (Fw)
<b>Myxothiazol</b>	<b>2 mg/l</b>	36%	267%	275%
	<b>1 mg/l</b>	154%	431%	376%
	<b>0,5 mg/l</b>	236%	504%	424%
	<b>0 mg/l</b>	396%	480%	537%
<b>Antimycin</b>	<b>5 mg/l</b>	4%	-51%	-
	<b>2 mg/l</b>	23%	-7%	-
	<b>0,5 mg/l</b>	147%	90%	31%
	<b>0 mg/l</b>	804%	646%	663%

Für die Selektion von potentiellen mitochondrialen Transformanten bedeutet dies, dass die Konzentrationen der Antibiotika Antimycin und Myxothiazol in der zweiten Woche angepasst wurden. Bei einer Selektion mit dem Hemmstoff Moa-Stilben wurde nur bei der Arabidopsis-Suspensionskultur die Hemmstoffkonzentration ab der zweiten Woche erhöht. Um den alternativen Weg der Elektronenübertragung in der Atmungskette zu verringern, wurden ab der dritten Woche 20  $\mu$ M nPG zu den potentiell transformierten Suspensionskulturen dazugegeben. In Tabelle 3.7 sind die zur Selektion von mitochondrialen Transformanten ermittelten Konzentrationen bei Suspensionskulturen dargestellt.

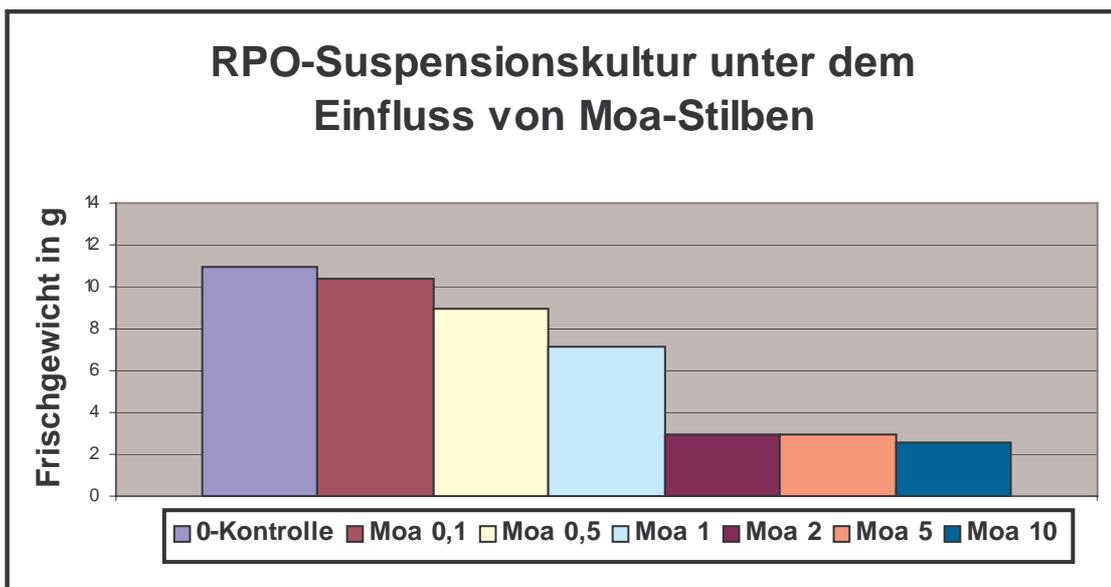
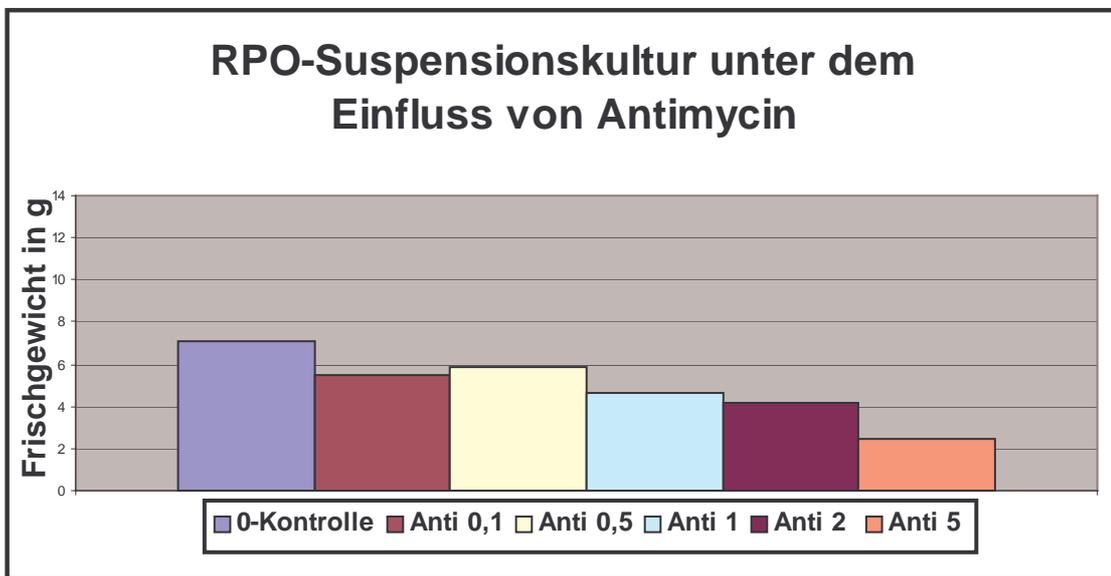
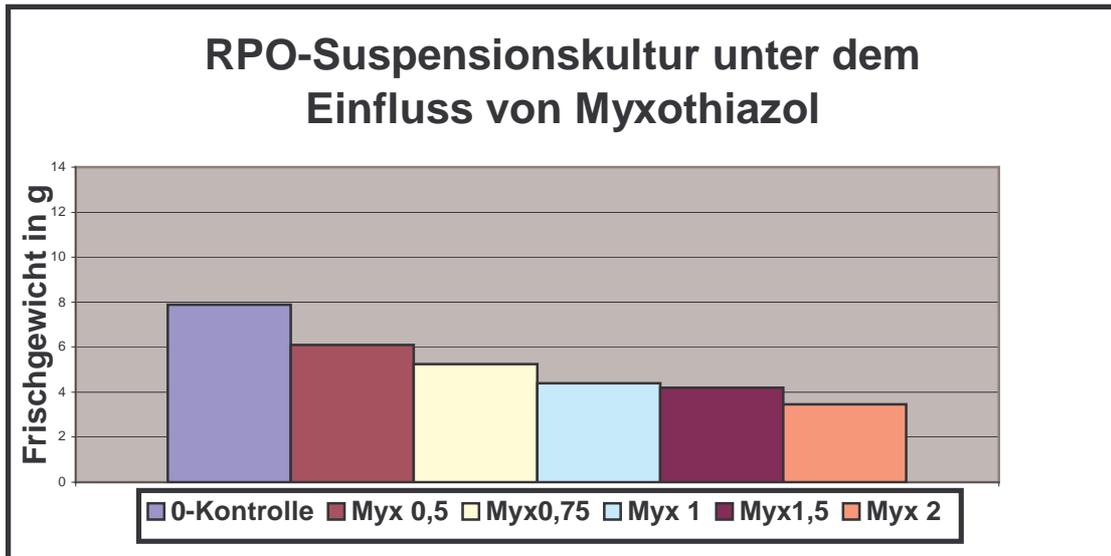
**Tab. 3.7 Hemmstoffkonzentrationen zur Selektion von Mitochondrientransformanten aus Suspensionskulturen.**

	<i>rpo</i> -Tabak			Arabidopsis		
	1. Woche	2. Woche	Ab 3. Woche	1. Woche	2. Woche	Ab 3. Woche
<b>Antimycin</b>	2mg/l	5mg/l	+20 $\mu$ M nPG	1mg/l	1,5mg/l	+20 $\mu$ M nPG
<b>Myxothiazol</b>	2mg/l	5mg/l	+20 $\mu$ M nPG	2mg/l	3mg/l	+20 $\mu$ M nPG
<b>Moa-Stilben</b>	1,5 $\mu$ M	1,5 $\mu$ M	+20 $\mu$ M nPG	2 $\mu$ M	3 $\mu$ M	+20 $\mu$ M nPG

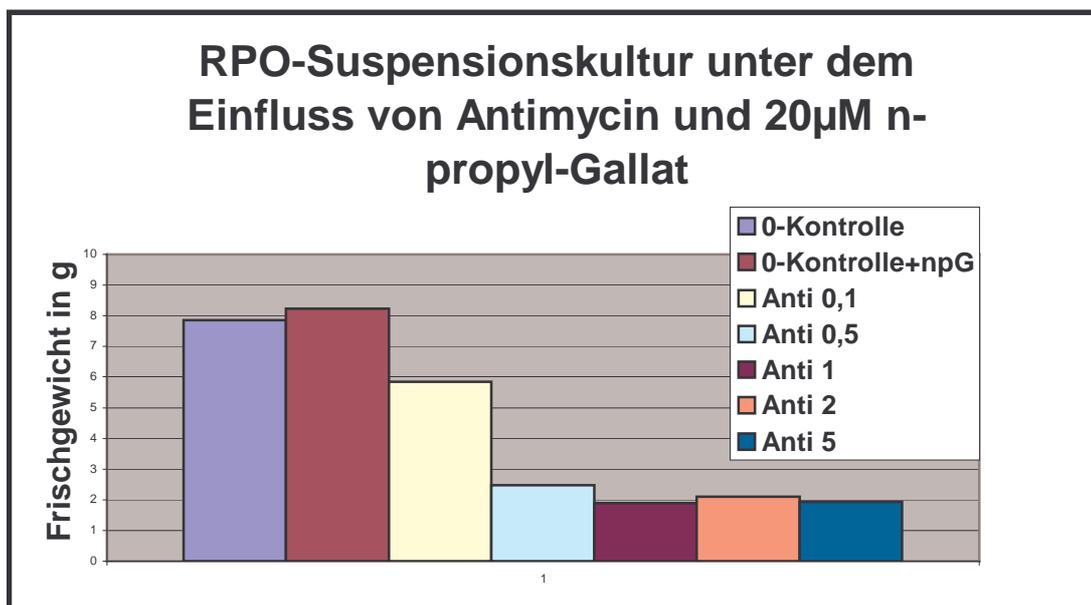
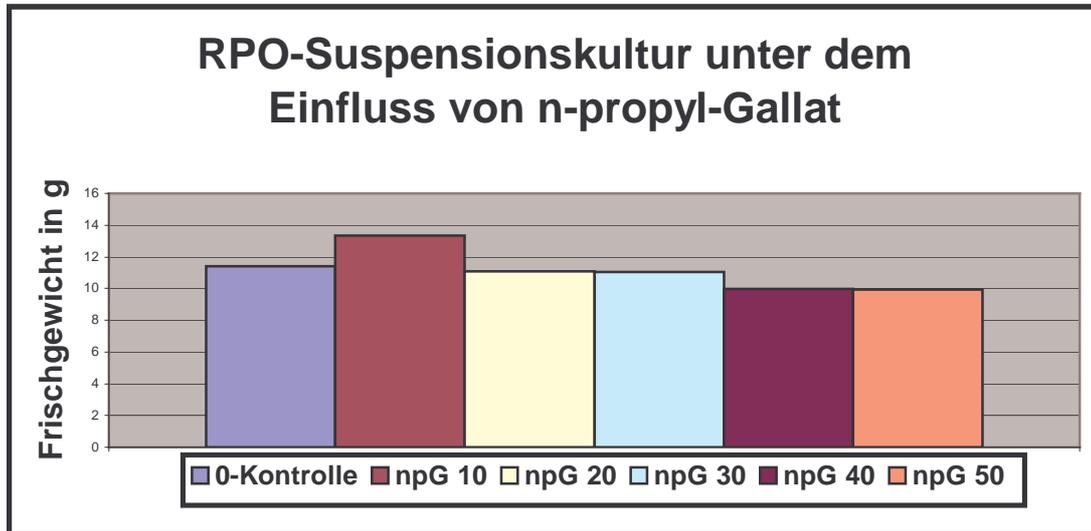
Der Regulationsmechanismus, der als Stressantwort die Aktivität der alternativen Oxidase reguliert, um den Elektronentransport aufrecht zu erhalten, benötigt offenbar in Abhängigkeit von der Pflanzenart und dem Hemmstoff eine gewisse Anlaufphase. Die Diagramme in Abb. 3.5 zeigen die Hemmwirkung der Antibiotika Antimycin, Myxothiazol und Moa-Stilben auf das Wachstum von *rpo*-Suspensionskulturen.

---

**Abb. 3.5** Regeneration von *rpo*-Suspensionkulturen unter dem Einfluss von Myxothiazol, Antimycin und Moa-Stilben. Dargestellt ist das Frischgewicht nach einer Regenerationszeit von 7 Tagen. Als Anfangsgewicht wurden 2g Suspensionskultur eingewogen und mit 20ml M<sub>4</sub>D Medium aufgefüllt.



In Abb. 3.6 ist die Wirkung von nPG und nPG in Kombination mit Antimycin bei *rpo*-Suspensionskulturen dargestellt. Die Testreihen der Arabidopsis-Suspensionen sind in den Diagrammen in Abb. 3.7 wiedergegeben. Im Diagramm B in Abb. 3.6 erkennt man, dass bei sofortiger Zugabe von 20  $\mu$ M nPG zur Antimycintestreihe schon ab 0,5 mg/l Antimycin fast kein Gewichtszuwachs mehr erfolgt.



**Abb. 3.6** Regeneration von *rpo*-Suspensionkulturen unter dem Einfluss von nPG sowie nPG und Antimycin. Dargestellt ist das Frischgewicht nach einer Regenerationszeit von 7 Tagen. Als Anfangsgewicht wurden 2g Suspensionskultur eingewogen und mit 20ml M<sub>4</sub>D Medium aufgefüllt.

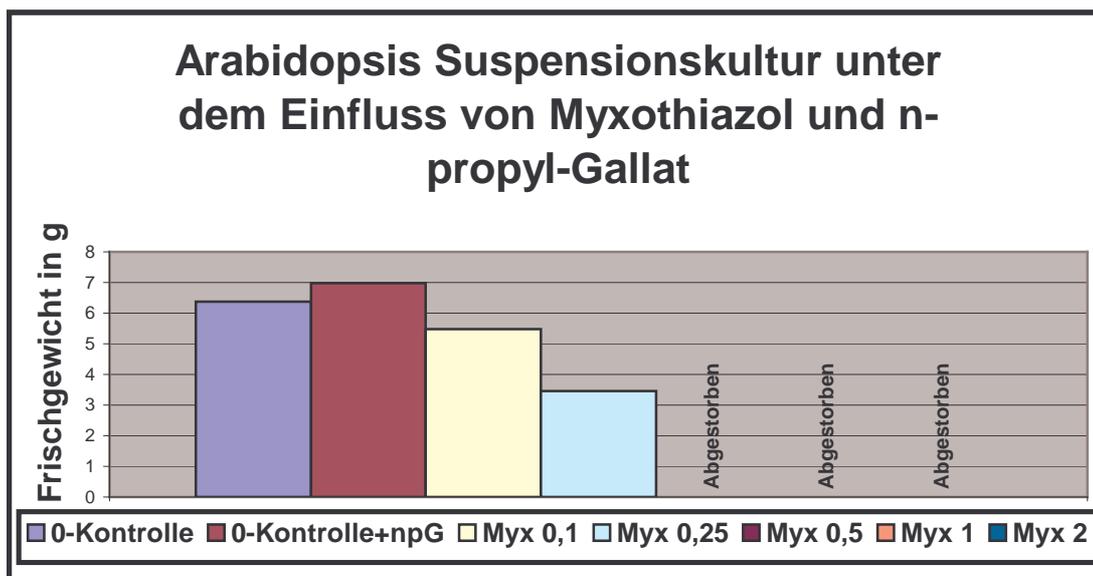
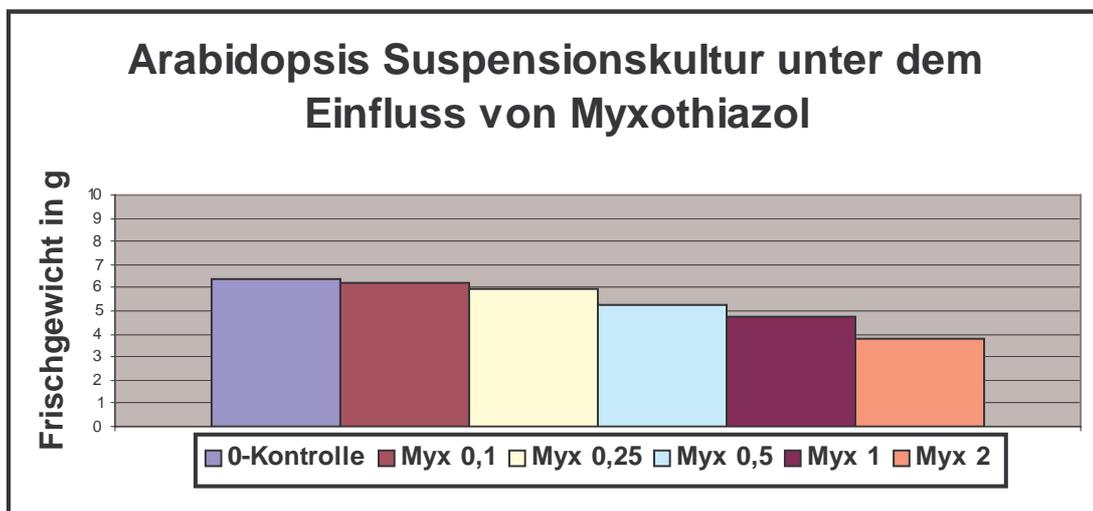
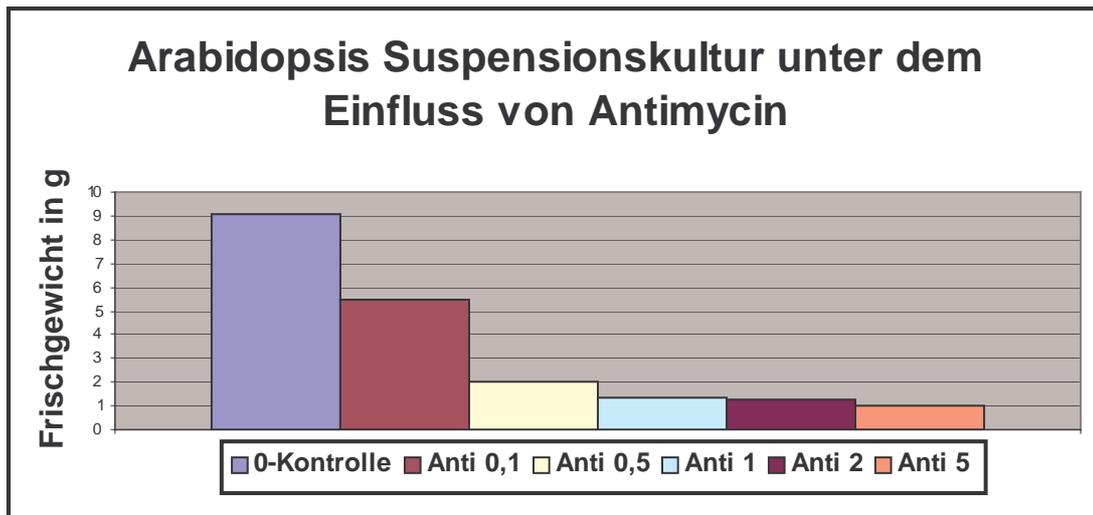


Abb. 3.7 Regeneration von Arabidopsis-Suspensionkulturen unter Einfluss von Myxothiazol, Antimycin und Myxothiazol und nPG. Dargestellt ist das Frischgewicht nach einer Regenerationszeit von 7 Tagen. Als Anfangsgewicht wurden 1g Suspensionskultur eingewogen und mit 20ml M<sub>4</sub>D Medium aufgefüllt.

### 3.1.2 Analyse der potentiellen Mitochondrientransformanten

#### 3.1.2.1 Analyse Chloramphenicol-resistenter Linien

Es wurden insgesamt vier unabhängige Transformationsexperimente mit der Resistenzvermittelnden Transformationskassette pBM*cat* I durchgeführt. Bei zwei Experimenten bei denen mittels „particle gun“ transformiert wurde, wurden insgesamt 18 Tabakblätter mit dem Transformationsvektor pBM*cat* I beschossen. Zur Regeneration stabiler Transformanten von Blättern erfolgte zwei Tage nach der Transformation ein Transfer der in 3-5 mm Ø große Stücke geschnittenen Blätter auf chloramphenicolhaltiges RMOP-Regenerationsmedium. Bei den zwei weiteren Transformationsexperimenten wurden Tabakprotoplasten mittels PEG-Methode mit dem Transformationsvektor pBM*cat* I transformiert. Nach der Transformation wurden die Protoplasten in 18 Kunststoffnetze eingebettet und wie unter Kapitel 2.9.4.4 beschrieben kultiviert. Die Selektion erfolgte mit einer Konzentration von 45 mg/l Chloramphenicol. Ab der 7. Woche konnten die ersten resistenten Sprossen identifiziert werden. Sobald es möglich war, die Sprosse vom Blattstück zu trennen, wurden sie isoliert und unter selektiven Bedingungen weiterkultiviert. Die Mehrzahl der identifizierten Sprossen wurde zwischen der 9. und 15. Woche nach der Transformation isoliert. Sobald genügend Pflanzenmaterial für eine DNA-Isolierung vorhanden war, ohne den Spross zu zerstören, wurde DNA isoliert und die Integration des *cat*-Gens per PCR getestet. Bei 4 von insgesamt 76 isolierten Sprossen konnte eine PCR-Analyse durchgeführt werden. Alle anderen Sprossen sind durch den erhöhten Selektionsdruck abgestorben. Die 4 analysierten Klone waren bezüglich der *cat*-Integration negativ (Tab 3.8).

#### 3.1.2.2 Analyse Antimycin- und Myxothiazol-resistenter Linien

Mit den Transformationskassetten pUM*anti* II, pUM*glu* II, pUM*arg* II und pUM*myx* II wurden jeweils zwei unabhängige PEG-Transformationsexperimente durchgeführt. Pro Transformationskassette wurden die Protoplasten anschließend in insgesamt 18 Kunststoffnetze eingebettet. Die Zugabe des Hemmstoffs erfolgte im 8-16 Zellstadium der Mikrokolonien nach ca. 7-12 Tagen Regeneration im Flüssigmedium. Die Anfangskonzentration lag bei Antimycin und Myxothiazol bei 3 mg/l und wurde nach einer Woche auf 5mg/l und nach zwei Wochen auf 10 mg/l erhöht. Eine Identifizierung von resistenten Sprossen oder Kallus die mit dem Transformationsvektoren pUM*anti* II (Selektion mit Antimycin), pUM*glu* II und pUM*arg* II (Selektion mit Myxothiazol) transformiert wurden, war nicht erfolgreich

Nach der Transformation von Protoplasten mit der Transformationskassette pUM*myx* II konnten 26 Myxothiazol-resistente Linien selektiert werden. Eine nachfolgende Analyse konnte keine Integration des mutierten *cob*-Fragmentes belegen (Tab 3.8). Die Analyse zur Identifikation von mitochondrialen Punktmutationen bei potentiellen Transformanten wird in Kapitel 3.1.2.2 beispielhaft beschrieben.

Die gleichen Transformationskassetten wurden zur Transformation von Arabidopsis und *rpo*-Tabak-Suspensionskulturen verwendet. Mit jedem Transformationsvektor wurden zwei unabhängige „particle gun“-Transformationen durchgeführt. D.h. es wurden bei Arabidopsis und *rpo*-Tabak je Transformationsvektor 16 Suspensionsansätze transformiert (siehe Kapitel 2.9.6.2). In Tab. 3.7 sind die Hemmstoffkonzentrationen von Antimycin und Myxothiazol für *rpo*-Tabak- und Arabidopsis-Suspensionkulturen dargestellt. Das Gewicht der Suspensionskulturen wurde alle 7 Tage festgestellt und mit der WT-0-Kontrolle bzw. der WT-Kontrolle (plus dem jeweiligen Hemmstoff) als Referenz verglichen. Innerhalb von 3-4 Wochen konnten jedoch keine Linien identifiziert werden, die sich von der WT-Kontrolle (plus dem jeweiligen Hemmstoff ) unterschieden hätten.

Tab. 3.8 Potentielle Mitochondrien-Transformanten

	„particle gun“-Transformation von Blattstücken			PEG-Transformation von Protoplasten		
	Anzahl selekt. Linien	PCR- Tests der Linien	Integration der Transforma- tionskassetten	Anzahl selekt. Linien	PCR- Tests der Linien	Integration der Transforma- tionskassetten
<b>pBMcat I</b>	76	4	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>pBMhph II</b>	90	25	23	14	14	6
<b>pBMhph III</b>	61	51	50	keine PEG- Transf. durchge- führt	keine PEG- Transf. durchge- führt	keine PEG- Transf. durchgeführt
<b>pBMhph IV</b>	33	18	16	keine PEG- Transf. durchge- führt	keine PEG- Transf. durchge- führt	keine PEG- Transf. durchgeführt
<b>pUMmyx II</b>	keine PG- Transf. durchge- führt	keine PG- Transf. durchge- führt	keine PG-Transf. durchgeführt	26	26	(-)
<b>pUManti II</b>	keine PG- Transf. durchge- führt	keine PG- Transf. durchge- führt	keine PG-Transf. durchgeführt	(-)	(-)	(-)
<b>pUMglu II</b>	keine PG- Transf. durchge- führt	keine PG- Transf. durchge- führt	keine PG-Transf. durchgeführt	(-)	(-)	(-)
<b>pUMarg II</b>	24	21	18 (3*)	(-)	(-)	(-)

### 3.1.2.3 Analyse Hygromycin-resistenter Linien

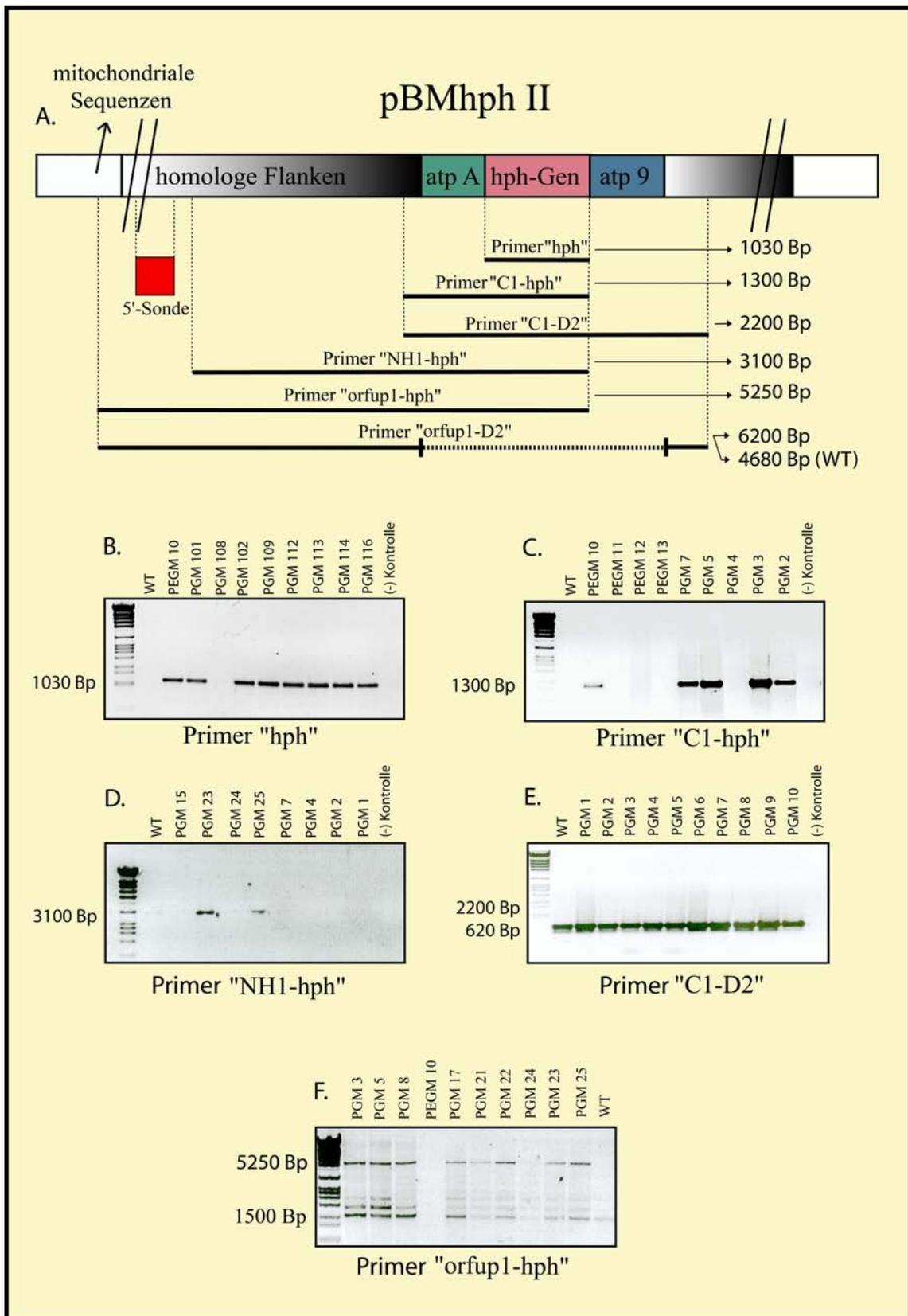
Mit den Transformationskassetten *pBMhph* II, *pBMhph* III und *pBMhph* IV wurden jeweils zwei unabhängige „particle gun“ Transformationsexperimente durchgeführt bei denen pro Transformationsvektor 18 Tabakblätter beschossen wurden. Mit dem Vektor *pBMhph* II wurden außerdem zwei PEG-Transformationen mit Tabakprotoplasten durchgeführt. Die transformierten Protoplasten wurden in 18 Kunststoffnetze eingebettet und wie unter Kapitel 2.9.4.4 beschrieben kultiviert. Die Selektion erfolgte bei einer stufenweise angepassten Hygromycin-Konzentration von 45 mg/l, 50 mg/l und 55 mg/l bei Blättern und 20 mg/l, 25 mg/l und 30 mg/l bei aus Blattprotoplasten regenerierten Mikrokolonien. Die Anpassung der Hemmstoffkonzentration erfolgte zum routinemäßigen Medienwechsel nach jeweils 8-10 Tagen. Nach vier Wochen konnten die ersten resistenten grünen Kallis identifiziert werden.

Insgesamt wurden 214 resistente Linien identifiziert, die zwischen der 6. und 16. Woche nach der Transformation isoliert wurden. 14 Linien stammen aus einer PEG-Transformation von Tabakprotoplasten, alle anderen wurden mit der biolistischen Methode transformiert. In Abb. 3.9 sind resistente Linien aus einer „particle gun“-Transformation mit Blattstücken und einer PEG-Transformation mit Protoplasten dargestellt.

Vergleichbar mit einer Analyse der *cat*-Klone, wurden in einem ersten Screening die resistenten Linien per PCR auf die Integration des Resistenz vermittelnden Gens *hph* getestet. Bei 95 Klonen konnte das *hph*-Gen nachgewiesen werden (Tab 3.8).

### 3.1.2.3.1 Analyse der pBM*hph* II- Transformanten

Die weitere Analyse der Klone, die mit der Transformationskassette pBM*hph* II transformiert wurden, gestaltete sich zu Beginn der Arbeit als sehr schwierig. Durch die fehlenden Sequenzinformationen im 5'-und 3'-Bereich des *orf87/nad3/rps12*-Clusters innerhalb der homologen Flanken sowie im 5'-Bereich von *orf87* außerhalb der homologen Flanken konnten erst nach Sequenzierung dieser Bereiche geeignete Primer konstruiert werden (siehe Kapitel 4.1.4.2 ). Bei Linien, bei denen das *hph*-Gen integriert war, wurden deshalb PCR-Analysen durchgeführt, bei denen der 3'-Primer im *hph*-Gen und die 5'-Primer im 5'-Bereich der flankierenden mitochondrialen Sequenz liegen. Damit sollte geklärt werden, ob bei einer zielortfremden Integration (Kern, Plastom, anderer Integrationsort im Mitochondriengenom) des *hph*-Gens noch weitere Bereiche der Transformationskassette integriert wurden (siehe Abb. 3.8).



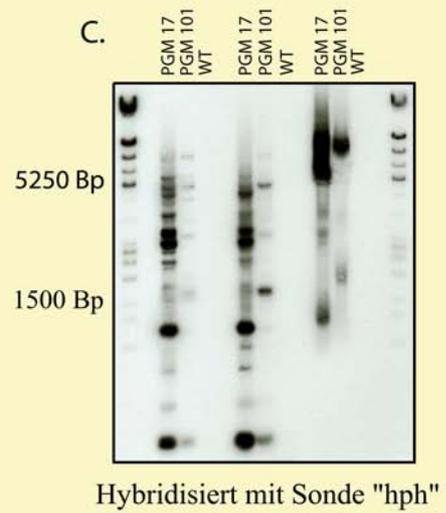
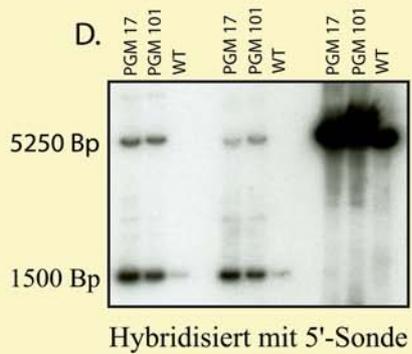
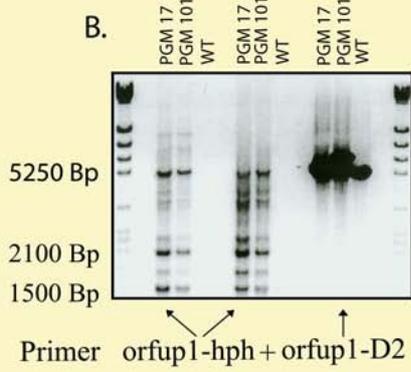
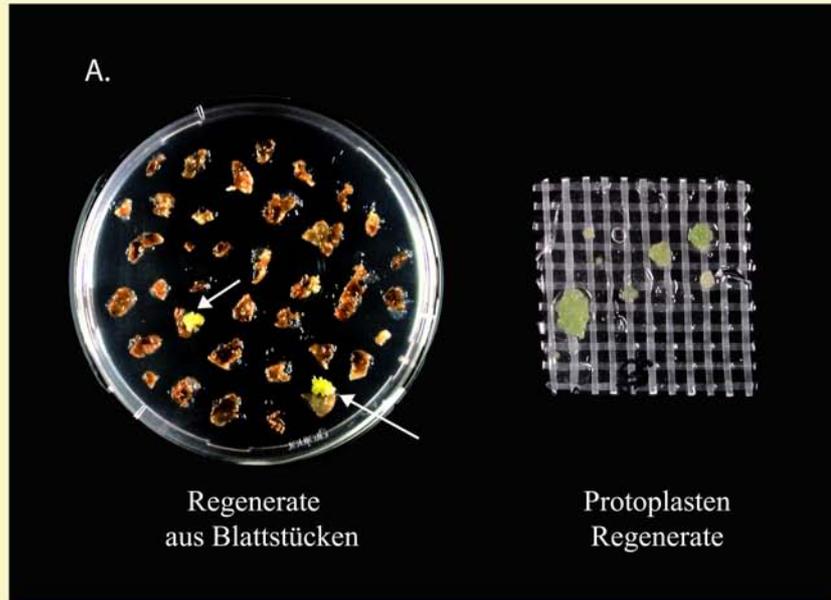
**Abb. 3.8** Analyse der mit der Transformationskassette *pBMhph II* transformierten Blattstücke und Protoplasten. A. Schematische Darstellung der Primerkombinationen und der Gensonden. B-E. PCR-Analysen ausgewählter potentieller mitochondrialer Transformanten mit verschiedenen Primerkombinationen. F. „Long-PCR“ von 10 potentiellen Transformanten. PGM: mit der biolistischen Methode transformierte Linien. PEG: mit der Polyethylen-Methode transformierte Linien.

Die Ergebnisse der PCR mit den Primerkombinationen C1/hph und NH1/hph zeigen, dass bei einem Teil der 23 positiven *hph*-Linien nicht die gesamte Transformationskassette integriert wurde. Bei der PCR mit der Primerkombination NH1/hph konnte bei 10 Linien eine 3100 Bp Bande identifiziert werden. Bei den anderen 13 Hygromycin-resistenten und *hph*-positiven Linien dürfte eine zielortfremde Integration stattgefunden haben. Die Analyse der Klone mit der Primerkombination C1/D2 sollte bei einer Integration der Transformationskassette eine Bande von 2200 Bp ergeben. Zusätzlich sollte eine Wildtypbande von 600 Bp vorhanden sein, da die Primer aus dem 5'- und 3'-Bereich der flankierenden Sequenz abgeleitet worden sind. Alle 23 positiven *hph*-Linien zeigten nur die 600 Bp große Wildtypbande.

Unter der Annahme, dass nur sehr wenige Transgene im Mitochondriengenom integriert sind, würde nur sehr wenig Template-DNA der Transformanten für eine PCR-Reaktion zur Verfügung stehen. Hinzu kommt, dass bei PCR-Reaktionen bevorzugt kleine Fragmentstücke amplifiziert werden. Ein fehlendes 2200 Bp Amplifikat ist somit kein sicheres Zeichen für eine fehlende Integration der Transformationskassette in das Mitochondriengenom.

---

**Abb. 3.9 „Long-PCR“ und Southern-Analysen von potentiellen mitochondrialen pBM*hph* II-Transformanten.** A. Selektion von potentiellen Transformanten aus Blattstücken und Protoplasten. B. „Long-PCR“ der ausgewählten Linien PGM 17 und PGM 101. Bei der Primerkombination orfup1/hph (Amplifikate links und in der Mitte) ist jeweils die gleiche PCR-Reaktion mit unterschiedlichen MgCl<sub>2</sub>-Pufferkonzentrationen dargestellt. Bei dem rechten Amplifikat handelt es sich um die Primerkombination orfup1/D2. C-D. Hybridisierung der „long-PCR“ aus B. mit der „hph“- und der „5“-Sonde.



Zur Klärung einer mitochondrialen Integration wurde mit den positiv getesteten Linien der Primerkombination NH1/hph eine „long-PCR“ durchgeführt. Ein Primer war dabei im 5'-Bereich von *orf87* außerhalb der flankierenden mitochondrialen Sequenzen, der andere Primer innerhalb des *hph*-Gens. Neben der erwarteten Bande mit einer Fragmentgröße von ca. 5250 Bp traten weitere Banden auf (Abb. 3.9B). Um abzuklären, ob es sich bei der 5250 Bp Bande tatsächlich um die erwartete Bande handelt, wurde das PCR-Produkt zum einen mit einer mitochondrialen Sonde aus dem 5'-Bereich der flankierenden mitochondrialen Sequenz und zum anderen mit dem *hph*-Gen hybridisiert. Die Hybridisierung mit der 5'-Sonde konnte eindeutig belegen, dass es sich bei dem 5250 Bp großen Signal um das gewünschte Fragment handelt (Abb. 3.9D). Ein zusätzliches 1500 Bp Fragment ist auch bei der WT-Kontroll-PCR zu beobachten. Die Hybridisierung mit der Sonde „*hph*“ zeigt im Gegensatz dazu eine Vielzahl von Banden unterschiedlicher Fragmentgrößen (Abb. 3.9C). Die Anzahl und Intensität der Banden variiert zwischen den einzelnen Klonen erheblich. Bei allen Klonen ist eine Bande im Bereich um 5250 Bp vorhanden. Zur weiteren Klärung einer mitochondrialen Integration wurde anstelle des *hph*-Primers ein Primer benutzt, der im 3'-Bereich der flankierenden mitochondrialen Sequenz liegt. Das daraus resultierende WT-Fragment ist wie erwartet ca. 4700 Bp groß. Zusätzlich sollte bei einer mitochondrialen Integration eine weitere Bande von ca. 6300 Bp vorhanden sein (*hph*-Gen und mitochondriale Regelemente). Beide Banden sind zwar schlecht zu unterscheiden, aber bei den Transformanten vorhanden (Abb. 3.9B). Eine Hybridisierung mit der 5'-Sonde bestätigt dies (Abb. 3.9D). Bei einer Hybridisierung mit der Sonde „*hph*“ sind bei den Linien PGM 17 und PGM 101 unterschiedliche Bandenmuster vorhanden. Eine einheitliche Fragmentgröße war nicht festzustellen.

Für Southern-Analysen wurden 12 µg Gesamt-DNA je Spur eingesetzt. Die DNA, der PCR positiv getesteten Linien wurde jeweils mit den Restriktionsenzymen *Nco* I, *Eco* 105I und *Xba* I verdaut. Hybridisiert wurden die Membranen mit der Sonde „*hph*“ oder „Sonde2“. Bei der „Sonde2“ handelt es sich um ein DNA-Sequenz aus dem 3'-Bereich der homologen mitochondrialen Flanken innerhalb der Transformationskassette (Abb. 3.10).

Bei einer Integration der Transformationskassette pBM*hph* II in das Mitochondriengenom, sollten bei einem DNA-Verdau der Linien PGM 5, 17, 23, 25, 26, 101 und 106 mit dem Restriktionsenzymen *Nco* I und einer Hybridisierung der Membran mit mit der „Sonde2“ zwei Banden vorhanden sein. Da die einzige bekannte *Nco* I-Schnittstelle innerhalb des *hph*-Gens lokalisiert ist und die Sequenzbereiche 5' und 3' außerhalb der homologen mitochondrialen Flanken nicht bekannt waren, kann über die genaue Größe der erwarteten

Signale keine Angaben gemacht werden. Die Wildtypbande muss jedoch mindestens 4600 Bp größer sein als die Bande, die auf eine Integration des Transgens hindeuten würde, da dies dem bekannten 5'-Bereich der *Nco* I-Schnittstelle entspricht. Abbildung 3.10B zeigt, dass bei allen Linien neben einem ca. 19 kB großen Signal, das auch bei dem Wildtyp vorhanden ist, noch weitere Hybridisierungssignale vorhanden waren. Ein ca. 3,9 kB großes Signal war nur bei den transformierten Linien PGM 5, 17, 23, 25, 26 und 101 vorhanden, nicht jedoch bei der Linie 106 und beim Wildtyp. Bei der Linie 17 und 25 war ein weiteres ca. 9,8 kB großes Signal vorhanden, welches beim Wildtyp fehlt. Alle weiteren Hybridisierungssignale zwischen den Linien waren unterschiedlich. Bei transformierten Linien deuten Signale gleicher Größe auf eine gezielte Integration, Signale unterschiedlicher Größe auf eine ungezielte Integration hin.

Bei der Hybridisierung der *Eco* 105I verdauten Linien PGM 5, 17, 23, 25, 26, 101 und 106 mit „Sonde2“ sollte das Signal der WT-0-Kontrolle ca. 1600 Bp (*Hph*-Gen und Regelemente) kleiner sein, als das Signal transformierter Linien. Da innerhalb der Transformationskassette keine *Eco* 105I Restriktionsschnittstelle vorhanden war, sollten die Hybridisierungssignale mindestens eine Größe von ca. 6 kB (Länge der homologen mitochondrialen flankierenden Sequenzen) bzw. 7,6 kB besitzen. Bei den mit „Sonde2“ hybridisierten Linien PGM 5, 17, 23, 25, 26, 101, 106 und der WT-Kontrolle war ein Signal von ca. 17 kB vorhanden. Ein weiteres ca. 7,6 kB großes Signal konnte bei den Linien 5, 17, 23, 25, 26 und 101 detektiert werden. Bei der WT-Kontrolle und der Linie 106 war kein Signal vorhanden. Die Linie 25 zeigte bei ca. 8 kB eine weitere Bande.

Die DNA der Linien 2, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 15, 16 und 17 wurde mit dem Restriktionsenzym *Xba* I verdaut und mit der Sonde „hph“ hybridisiert. *Xba* I scheidet an zwei Positionen im 5'- und 3'-Bereich des *hph*-Gens in den homologen mitochondrialen Sequenzen innerhalb der Transformationskassette pBM*hph* II. Bei einer mitochondrialen Integration sollte ein Transformationssignal mit einer Größe von 4,2 kB vorhanden sein. Ein Signal der WT-0-Kontrolle wäre bei einer Hybridisierung mit der Sonde „hph“ nicht zu erwarten. Bei den Linien 2, 6, 7, 8, 10, 11, 15, 16 und 17 war ein ca. 4,2 kB großes Signal vorhanden. Weitere unterschiedliche Signale konnten bei den Transformationslinien 8, 15, 16 und 17 gezeigt werden. Ein Signal der WT-Kontrolle war nicht vorhanden (Abb. 3.10C).

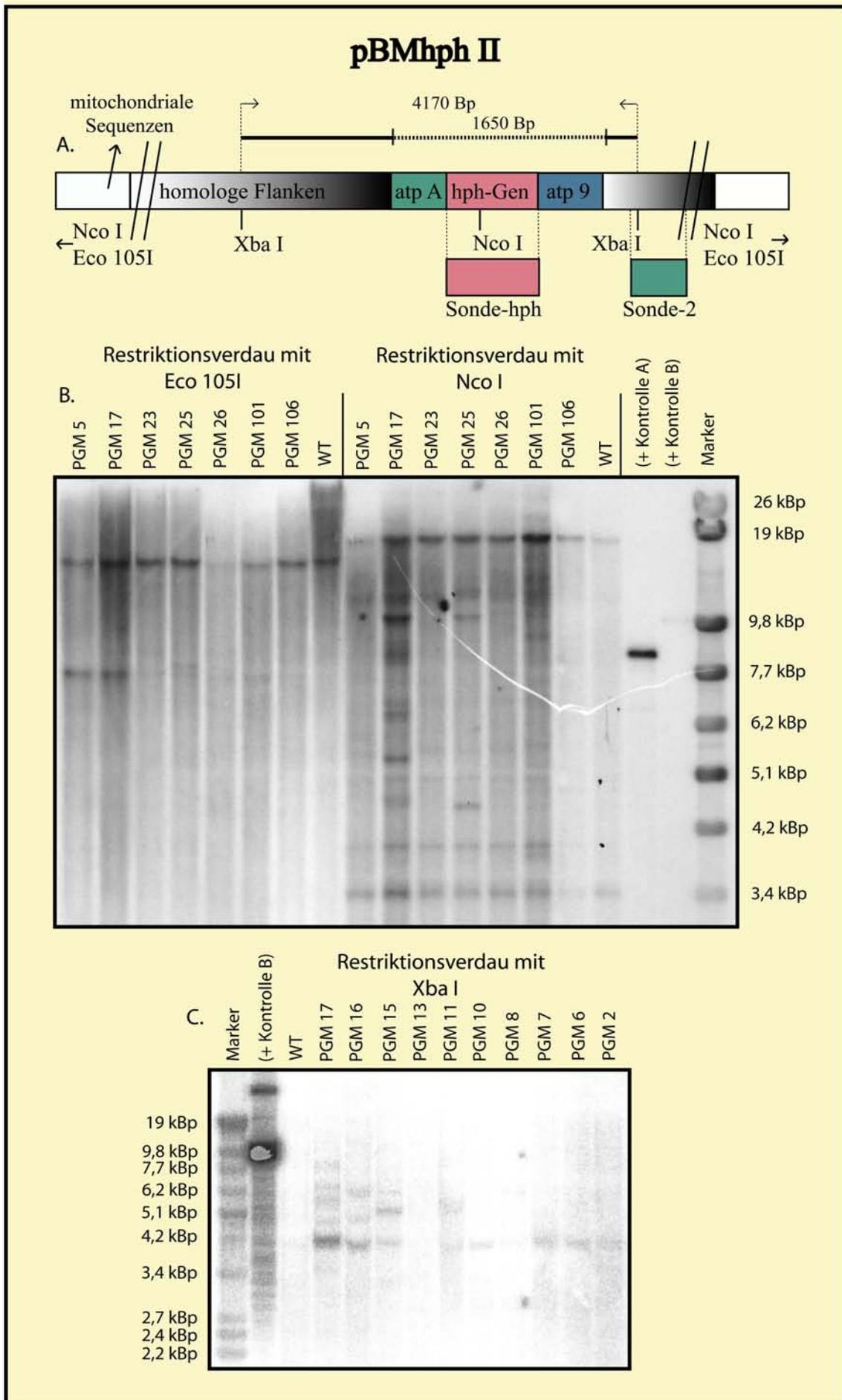
Bei Betrachtung der „long PCR“- und aller Southern-Analysen sind einige potentielle Kandidaten für eine erfolgreiche Mitochondrientransformation vorhanden. Die Linien PGM 5, 17, 23, 25 und 101 zeigten bei der „long PCR“ ein Signal in der erwarteten Größe. Bei Southern-Analysen, deutet ein 7,6 kB große Signal, dass bei dem Restriktionsverdau der

DNA mit *Eco* 105I sowie ein 3,9 kB großes Signal, dass bei dem Restriktionsverdau der DNA mit *Nco* I bei einer Hybridisierung mit der „Sonde2“ vorhanden war, auf eine gezielte mitochondriale Intergration der Transformationskassette. Die Linie PGM 26 zeigt ebenfalls die 7,6 und 3,9 kB großen Signale bei den zwei Southern-Analysen. Eine „long PCR“ wurde mit dieser Linie nicht durchgeführt. Mit den positiven „long PCR“-Linien PGM 3, 21, 22 und 24 konnten keine Southern-Analysen durchgeführt werden. Die Regeneration dieser Linien auf selektivem Medium war zu schwach, um genügend Kallusmaterial für eine Southern-Analyse zu extrahieren. Die Linie PGM 8 zeigte sowohl bei der „long PCR“, als auch bei der Southern-Analyse, bei der die DNA mit dem Restriktionsenzym *Xba* I verdaut und mit der Sonde „hph“ hybridisiert wurde, die für eine mitochondriale Integration erwarteten Signale. Bei den Linien PGM 2, 6, 7, 10, 11, 15 und 16 wurde nur eine Southern-Analyse durchgeführt. Der Verdau der DNA mit dem Restriktionsenzym *Xba* I und Hybridisierung mit der Sonde „hph“ zeigte zwar die korrekte Signalgröße von 4,2 kB, ein eindeutiger Nachweis einer mitochondrialen Integration war jedoch nicht möglich, da das Restriktionsenzym *Xba* I zweimal innerhalb der Transformationskassette schneidet. Die Linie PGM 17 zeigte bei der „long PCR“ und bei den drei verschiedenen Southern-Analysen die erwarteten Signale, die auf eine mitochondriale Integration der Transformationskassette hinweisen. Bei den meisten analysierten Linien waren jedoch weitere Signale vorhanden. Diese Signale lassen eine zusätzliche Integration der Transformationskassette an einen anderen Ort des mitochondrialen Genoms sowie einer ungezielten Integration in das Kerngenom vermuten.

---

**Abb. 3.10 Southern-Analysen potentieller mitochondrialer pBM*hph* II-Transformanten.**

A. Schematische Darstellung der Gensonden und der Restriktionsschnittstellen. B. Southern-Analyse von potentiellen mitochondrialen Transformanten. Hybridisiert wurde mit der „Sonde 2“. Verdaut wurde die Gesamt-DNA mit den Restriktionsenzymen *Eco* 105I (linker Bereich) und *Nco* I (rechter Bereich). Die (+Kontrolle) A stammt von einem linearisierten Vektor, der die homologen mitochondrialen flankierenden Sequenzen enthielt. Als (+Kontrolle) B wurde der linearisierte Transformationsvektor pBM*hph* II verwendet.



### 3.1.2.3.2 Analyse der pBM*hph* III- und pBM*hph* IV- Transformanten

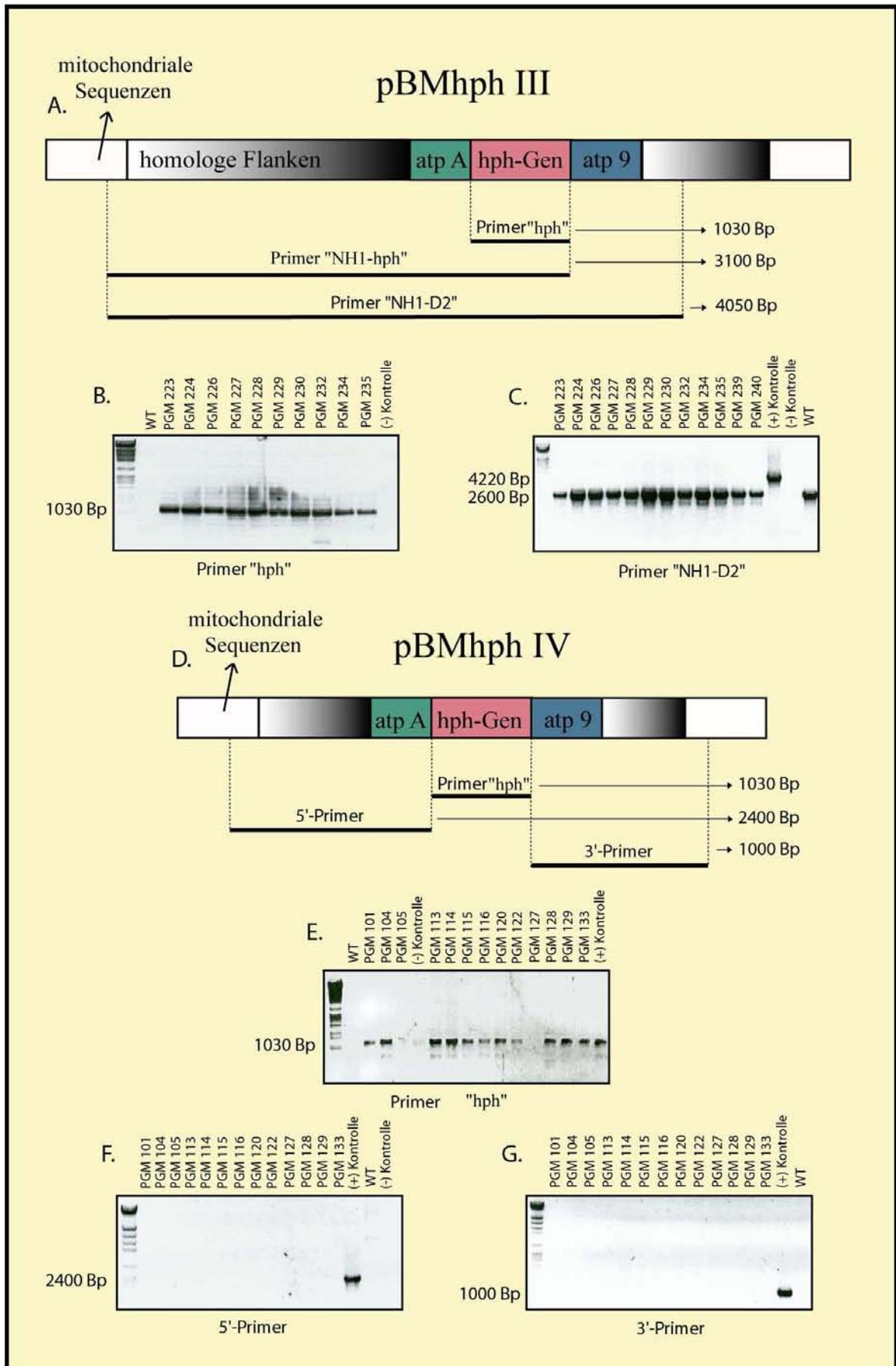
Die Transformationskassetten pBM*hph* III und pBM*hph* IV sind identisch zu pBM*hph* II mit dem Unterschied, dass die homologen Flanken verkürzt sind (siehe Abb. 2.4). Das *hph*-Gen konnte per PCR bei 66 resistenten Linien nachgewiesen werden.

Zum korrekten Nachweis einer gezielten Integration des Transformationsvektors pBM*hph* III in das mitochondriale Genom wurden zwei unterschiedliche Primerkombinationen verwendet. Zum einen wurde die Primerkombination NH1/*hph* benutzt, die auch bei der Analyse der pBM*hph* II- Transformanten verwendet wurde. Bei dem Transformationsvektor pBM*hph* III befindet sich die NH1-Primersequenz nicht mehr innerhalb des Transformationsvektors, sondern im 5'-Bereich ausserhalb der mitochondrialen flankierenden Sequenzen. Bei einer korrekten Integration der Transformationskassette wäre eine 3100 Bp große Bande zu erwarten gewesen. Es konnte jedoch kein positives Signal detektiert werden (ohne Abb.). Die Primer NH1/D2 liegen im 5' bzw. 3' Bereich ausserhalb der flankierenden homologen mitochondrialen Sequenzen. Folglich ist bei jeder Probe ein WT-Signal von ca. 2600 Bp zu erwarten. Bei positiven mitochondrialen Transformanten muss zusätzlich eine ca. 4200 große Bande vorhanden sein. Außer der (+)-Kontrolle (Transformationskassette pBM*hph* II) war kein 4200 Bp großes Signal zu detektieren.

Zur Analyse der pBM*hph* IV-Transformanten wurden bei 16 *hph*-positiv getesteten Linien Primerkombinationen verwendet, die eine gezielte 5'- oder 3'-Integration der Transformationskassette in das Mitochondriengenom ermöglichen sollte. Diese PCR-Analyse war bei allen transformierten Linien negativ. Nur die (+)-Kontrolle (Transformationskassette pBM*hph* II) zeigte ein korrektes Signal. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Linien um Transformanten, bei denen das *hph*-Gen in das Kern- oder Plastidengenom von Tabak integriert wurde. In Abb. 3.11 ist das Analyseschema und die Analyseergebnisse beispielhaft dargestellt.

---

**Abb. 3.11 Analyse der mit der Transformationskassette pBM*hph* III und pBM*hph* IV transformierten Blattstücke.** A und D. Schematische Darstellung der Primerkombinationen zur Analyse von pBM*hph* III und pBM*hph* IV. B-C und E-G. PCR-Analysen ausgewählter potentieller mitochondrialer Transformanten mit verschiedenen Primerkombinationen.

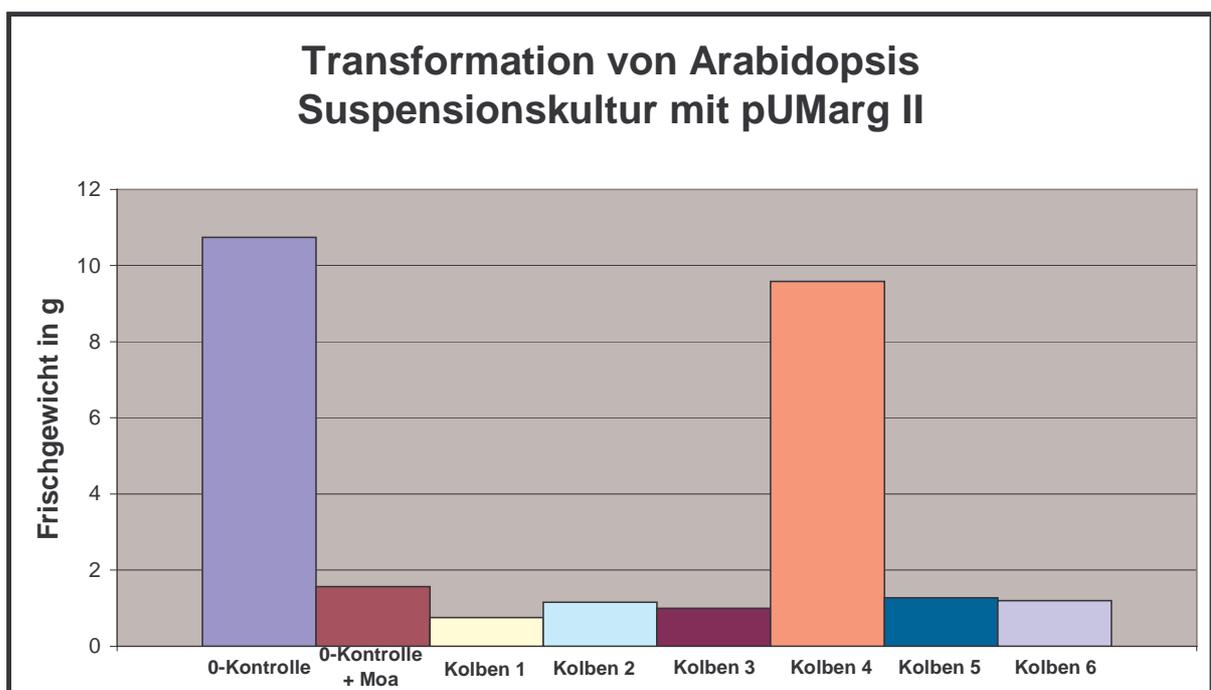


### 3.1.2.4 Analyse Moa-Stilben-resistenter Linien

Mit der Transformationskassette pUMarg II bei einer Selektion mit Moa-Stilben als Hemmstoff wurden zwei Transformationsexperimente mit Tabakblattstücken, zwei Transformationsexperimente mit *rpo*-Blattstücken, je zwei Transformationsexperimente mit Arabidopsis- und *rpo*-Tabak-Suspensionskulturen sowie je ein Transformationsexperiment mit Protoplasten von Tabak bzw. *rpo*-Tabak durchgeführt.

Bei PEG-Transformationen mit Tabak- und *rpo*-Tabak-Protoplasten konnten keine resistenten Zellkolonien identifiziert werden. Nach Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  Moa-Stilben im 8-16 Zellstadium nach ca. 7 Tagen war nur eine geringe Teilungsrate der Mikrokolonien zu beobachten. 14 Tage nach der Transformation wurde die Konzentration von Moa-Stilben auf 5  $\mu\text{M}$  erhöht. Die Zellkolonien sind unter dem erhöhten Selektionsdruck im weiteren Verlauf abgestorben.

Zur Transformation von *rpo*-Tabak und Arabidopsis-Suspensionskulturen mit der Transformationskassette pUMarg II wurden insgesamt 32 Suspensionsansätze mit der „particle gun“ transformiert und anschließend mit Moa-Stilben selektiert. Es konnte eine Linie identifiziert werden, die resistent gegenüber Moa-Stilben war. Nach einer Regenerationszeit von einer Woche unter selektiven Bedingungen (2  $\mu\text{M}$  Moa-Stilben) war die Gewichtszunahme bei dieser Linie vergleichbar mit der Gewichtszunahme der 0-Kontrolle. In Abb. 3.12 ist das Frischgewicht der Linie (Kolben Nr. 4) nach einer Woche im Vergleich zur Nullkontrolle und weiteren Transformanten dargestellt.



**Abb. 3.12 Transformation von Arabidopsis-Suspensionskultur mit der Transformationskassette pUMarg II.** Dargestellt ist das Frischgewicht nach einer Regenerationszeit von 7 Tagen. Als Anfangsgewicht wurden 1g Suspensionskultur eingewogen und 20ml M<sub>4</sub>D Medium zugegeben. Selektiert wurde mit 2 µM Moa-Stilben.

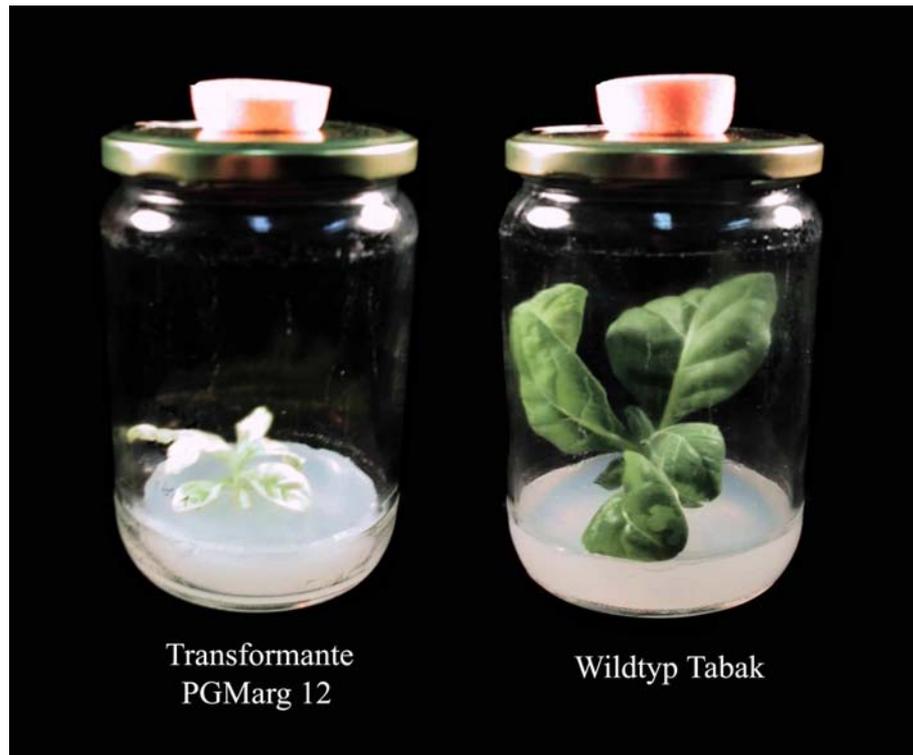
Die unter Kapitel 3.1.2.2 beschriebene Analyse des Klons war negativ. Ab der zweiten Woche wurde, wie in den Regenerationsexperimenten ermittelt (Kapitel 3.1.1.3), die Moa-Stilben-Konzentration auf 3 µM erhöht. Bei weiteren Messungen des Frischgewichtes nach der zweiten, dritten und vierten Woche konnte kein Unterschied zu den anderen Transformanten (Kolben 1, 2, 3, 5 und 6) festgestellt werden.

Die Selektion Moa-Stilbenresistenter Tabak- und *rpo*-Tabak-Linien aus Blattstücken erfolgte bei Hemmstoffkonzentrationen von 25-50 µM (Tabak) bzw. 10-20 µM (*rpo*-Tabak). Erste resistente Tabaklinien konnten in der fünften Woche, erste *rpo*-Tabaklinien konnten in der siebten Woche identifiziert werden. Sobald es möglich war, die Sprosse vom Blattstück zu trennen, wurden sie isoliert und unter selektiven Bedingungen weiterkultiviert. Die Mehrzahl der resistenten Linien wurde zwischen der 5. und 7. Woche isoliert. Sobald genügend Pflanzenmaterial für eine DNA-Isolierung vorhanden war, wurde mit ersten PCR-Analysen begonnen. Von 23 selektierten Linien konnten 20 charakterisiert werden. Bei 18 Linien konnte das modifizierte *cob*-Fragment nachgewiesen werden (Tab 3.8). Zwei resistente *rpo*-Tabak-Linien waren negativ.

Die hier beschriebene Charakterisierung der Transformanten erfolgte durch Analyse von DNA-Material aus dem zweiten Regenerationszyklus. Zur vollständigen Segregation des modifizierten *cob*-Fragments von den WT-*cob*-Fragmenten innerhalb des Chondrioms, wurden mehrere „Zyklisierungen“ durchgeführt. Dies bedeutet, dass nach ca. zwei bis vier Wochen Regeneration der isolierten Linien auf hemmstoffhaltigem Medium grüne Sektoren abgeschnitten wurden und auf neuem, hemmstoffhaltigem Regenerationsmedium ausgelegt wurden. Diese Zyklisierungsschritte wurden zwei bis drei Mal wiederholt. In Abb. 3.13 ist der analysierte Klon PGMarg 12 exemplarisch dargestellt.

---

**Abb. 3.13 Exemplarische Darstellung der Moa-Stilben-resistenten Transformante PGMarg 12.** Dargestellt ist eine Transformante im 2. Regenerationszyklus. Die selektive Moa-Stilben-Konzentration betrug zu Beginn der Selektion 25 µM und wurde nach jeder Woche stufenweise auf 50 µM erhöht.



Zur eindeutigen Analyse der mitochondrialen Transformanten wurden zusätzlich zur resistenzverleihenden Punktmutation drei neutrale Punktmutationen in die Transformationskassette eingeführt. Eine Punktmutation zerstört dabei die im WT-*cob*-Fragment vorhandene Restriktionsschnittstelle *Hind* III, die anderen zwei Punktmutationen kreieren eine neue Restriktionsschnittstelle *Age* I. Als erster Schritt im Analyseweg wurde die isolierte Gesamt-DNA mit *Hind* III verdaut. Anschließend wurde eine PCR mit Primern 5'- und 3'- der *Hind* III-Schnittstelle innerhalb der *cob*-Gen-Sequenz durchgeführt. Normalerweise sollte nur dann ein Fragment amplifiziert werden, wenn das mutierte *cob*-Fragment integriert worden ist. Alle WT-*cob*-Fragmente müssten bei vollständigem Restriktionsverdau mit *Hind* III geschnitten worden sein. Eine Amplifikation des *cob*-Fragmentes wäre damit für die WT-*cob*-Sequenz nicht möglich. Leider war es in der Praxis trotz zahlreicher Versuche mit unterschiedlicher DNA,- Enzym- oder Pufferkonzentrationen nicht möglich, das WT-*cob*-Fragment vollständig zu verdauen. Als zweiter Analyseschritt wurde deshalb eine Nested-PCR mit den erneut *Hind* III verdauten *cob*-Fragment-Amplifikaten der ersten PCR durchgeführt. Die amplifizierten Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *Age* I verdaut. Das mutierte *cob*-Fragment sollte dann in zwei Fragmente mit einer Größe von 397 und 178 Bp gespalten werden. Vorhandene WT-*cob*- oder unverdaute *cob*-Fragmente besitzen die Größe von 575 Bp. Wie in Abb. 3.14 beispielhaft an drei Klonen dargestellt ist, sind neben der WT-Bande von 575 Bp auch die zwei Banden in der Größe von ca. 400 und 180 Bp vorhanden, was der errechneten Größe von 397 und 178

Bp entspricht. Beide Banden wurden aus dem Gel eluiert und sequenziert. Bei der Sequenzierung des 397 Bp großen Fragmentstückes war es nicht möglich, bis in den Bereich der Punktmutationen vorzudringen (Abb. 3.14E). Die Sequenzierung des kleineren Fragmentes zeigt die Integration der Punktmutation, die zu der Zerstörung der *Hind* III-Schnittstelle führt. Sie endet erwartungsgemäß an der neu eingeführten *Age* I-Schnittstelle. In Abb. 3.14 ist die Analyse und das Analyseschema der Moa-Stilben-resistenten Linien dargestellt.

---

**Abb. 3.13 Analyse Moa-Stilben-resistenter Linien.** A. Schematische Darstellung der Primerkombinationen zur Analyse von pUMarg II. B. PCR der mit *Hind* III verdauten Linien mit den Primern „cob“. C. Nested-PCR von ausgewählten Klonen der mit *Hind* III verdauten Templates von B. D. Verdau der Nested-PCR-Reaktion mit *Age* I. E-F. Sequenzvergleich der Klone PGMarg8 und PGMarg12 mit dem Tabak-WT und der Transformationskassette pUMarg II.



Um auszuschließen, dass noch in der Pflanzenzelle vorhandene Transformationsvektoren für dieses Ergebnis verantwortlich sind, wurde zum einen eine PCR-Analyse und zum anderen ein Nachweis des Plasmids durch „plasmid recovery“-Transformation von Bakterien durchgeführt. Weder eine PCR mit den Primern *M13for* und *cobrev* mit Transformanten-DNA als Template noch eine „plasmid recovery“-Transformation, bei der die DNA der Transformanten mittels Elektroporation in *E.coli* transformiert wurde, konnten Transformationsvektoren nachweisen. Damit ist die Integration des mutierten *cob*-Fragmentes in den getesteten Linien eindeutig erwiesen. Ob es zu einer Integration innerhalb des mitochondrialen *cob*-Gens gekommen ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden. PCR-Analysen mit einem Primer innerhalb des *cob*-Fragmentes und einem Primer im 3'-Bereich außerhalb des *cob*-Fragmentes zeigten zwar das erwartete Fragment, ein Restriktionsverdau mit *Age* I blieb aber erfolglos.

## 3.2 Stabile Transformation von Plastiden

Ziel der Arbeit bei dem plastidären Ansatz war es, durch Plastidentransformation zum einen den Gehalt der essentiellen Aminosäure Lysin zu erhöhen und zum anderen ein neues antibiotikumfreies plastidäres Selektionssystem zu entwickeln. Als sogenanntes „Markergen“ kam das mutierte *dhdps-r1*-Gen aus dem Kerngenom von Tabak zum Einsatz. Durch plastidäre Transformation mit diesem Gen sollte der „feedback“-Regulationsmechanismus der DHDPS inhibiert werden und die Regulation der Lysinproduktion innerhalb des Aspartatstoffwechsels beeinträchtigt werden. Als Folge würde sich eine gesteigerte Lysinproduktion und damit verbunden eine Selektionsmöglichkeit plastidärer Transformanten mit dem Lysinanaloga AEC ergeben.

### 3.2.1 Bestimmung der Selektionsbedingungen

Eine Transformation von Tabak mit dem *aadA*-Gen als „Markergen“ und Spectinomycin/Streptomycin als selektivem Hemmstoff ist bei Kern- sowie Plastidentransformationen etabliert. Die Hemmstoffkonzentrationen zur Selektion von plastidären Transformanten sind sowohl für Blattstücke als auch Protoplasten beschrieben worden.

Für die plastidäre Transformation von Kartoffellblättern beschreiben Sidorov et al. (1999) eine Selektion mit 300-500 mg/l Spectinomycin/Streptomycin. Mit zwei unterschiedlichen Transformationsvektoren konnten sie insgesamt sechs plastidäre Transformanten mit dem *aadA*-Gen als „Markergen“ und Spectinomycin/Streptomycin als selektivem Hemmstoff selektieren.

Bei Kerntransformationen von Tabakblattstücken wurde für die Selektion mit AEC als Hemmstoff ein Konzentrationsbereich von 40-50  $\mu\text{M}$  AEC verwendet (Negrutiu et al., 1984). In dieser Arbeit wird die Regenerationsfähigkeit von Tabakblattstücken und Protoplasten sowie Kartoffelblattstücken unter selektiven Bedingungen mit AEC als Hemmstoff untersucht.

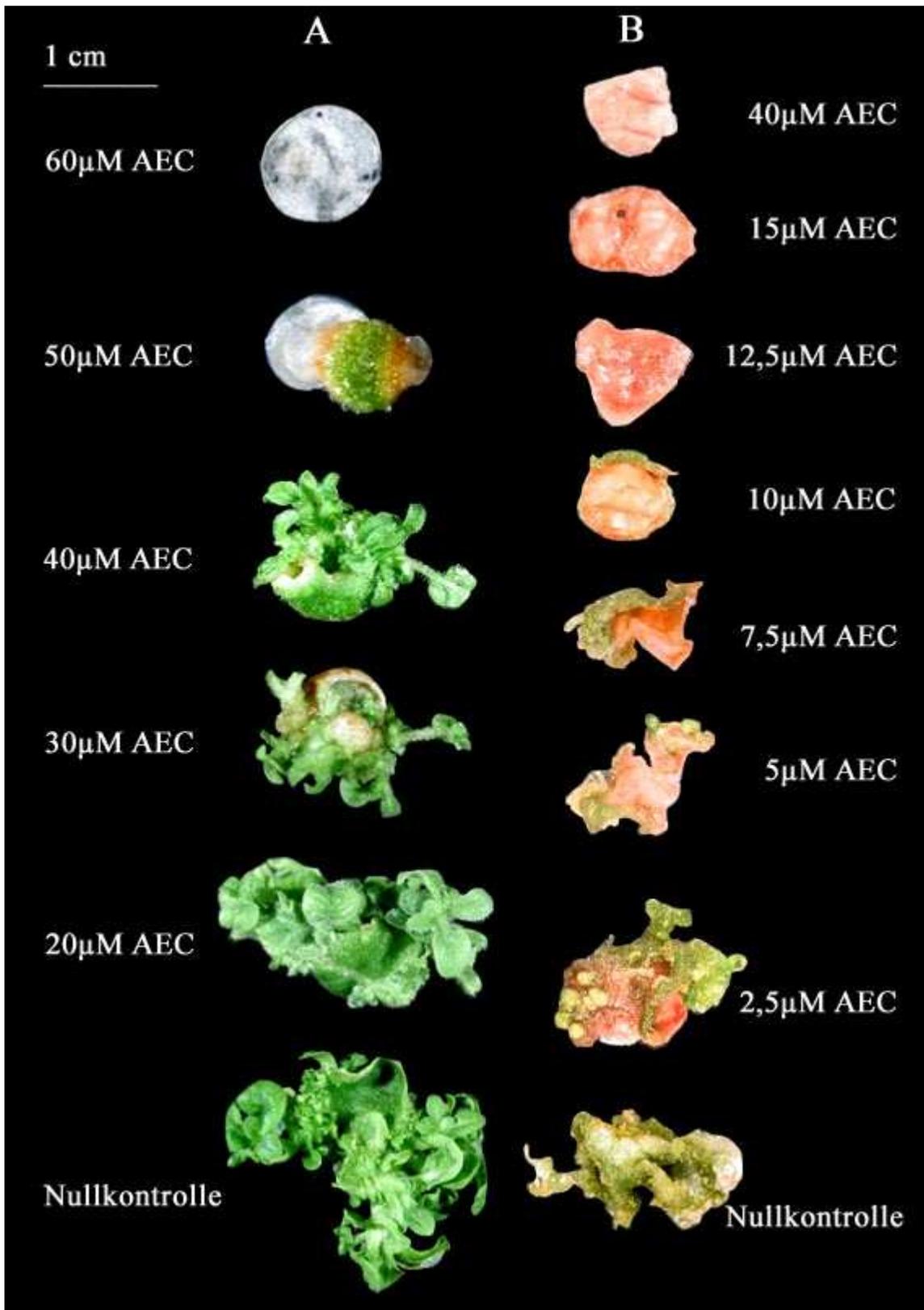
### 3.2.1.1 Selektionsbedingungen bei Tabak

#### 3.2.1.1.1 Selektionsbedingungen bei Blattstücken

In dieser Arbeit durchgeführte Regenerationsversuche bei Tabakblattstücken mit AEC als Hemmstoff ergaben einen ähnlichen Konzentrationsbereich wie in der Arbeit von Negrutiu et al. (1984). In den Testreihen bei Blattstücken wurde ein Konzentrationsbereich von AEC gewählt, der zwischen 20-60  $\mu\text{M}$  (0/20/30/40/50/60) AEC lag. Die Blattstücke wurden wie bei den Regenerationstests der mitochondrialen Hemmstoffe mit einem 10 mm  $\varnothing$  Korkbohrer ausgestanzt. Bei AEC-Konzentrationen von bis zu 40  $\mu\text{M}$  war ein starkes Sprosswachstum zu beobachten. Bei 50  $\mu\text{M}$  war kein Sprosswachstum vorhanden und nur noch geringes Kalluswachstum festzustellen. Die Blattstücke waren bereits zum größten Teil abgestorben und die grünen Kallusbereiche von braunen Rändern umgeben. Bei 60  $\mu\text{M}$  waren alle Blattstücke abgestorben. Zur Selektion plastidärer Transformanten wurde in den ersten drei Wochen eine Konzentration von 55  $\mu\text{M}$  AEC ausgewählt, um ein Durchwachsen von falsch positiven Sprossen zu vermeiden. Danach erfolgte eine stufenweise Absenkung der AEC-Konzentration auf 45, 40 und 35  $\mu\text{M}$  AEC jeweils mit dem Medienwechsel nach 10-12 Tagen. Abb. 3.15A zeigt die Wirkung von AEC auf die Regenerationsfähigkeit von Tabakblattstücken.

---

**Abb. 3.15 Wirkung von AEC auf die Regenerationsfähigkeit von Tabak- und Kartoffelblattstücken.** Tabakblattstücke ( Testreihe A) wurden mit einem 10mm Korkbohrer ausgestochen und auf RMOP-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen AEC ausgelegt. Kartoffelblattstücke (Testreihe B) wurden auf eine Kantenlänge von ca. 0,8 mm zugeschnitten und auf Kartoffelregenerationsmedium mit verschiedenen Konzentrationen AEC aufgelegt. Nach einer Regenerationszeit von 5 (Tabak) bzw. 4 Wochen (Kartoffel) wurde die Hemmwirkung dokumentiert.

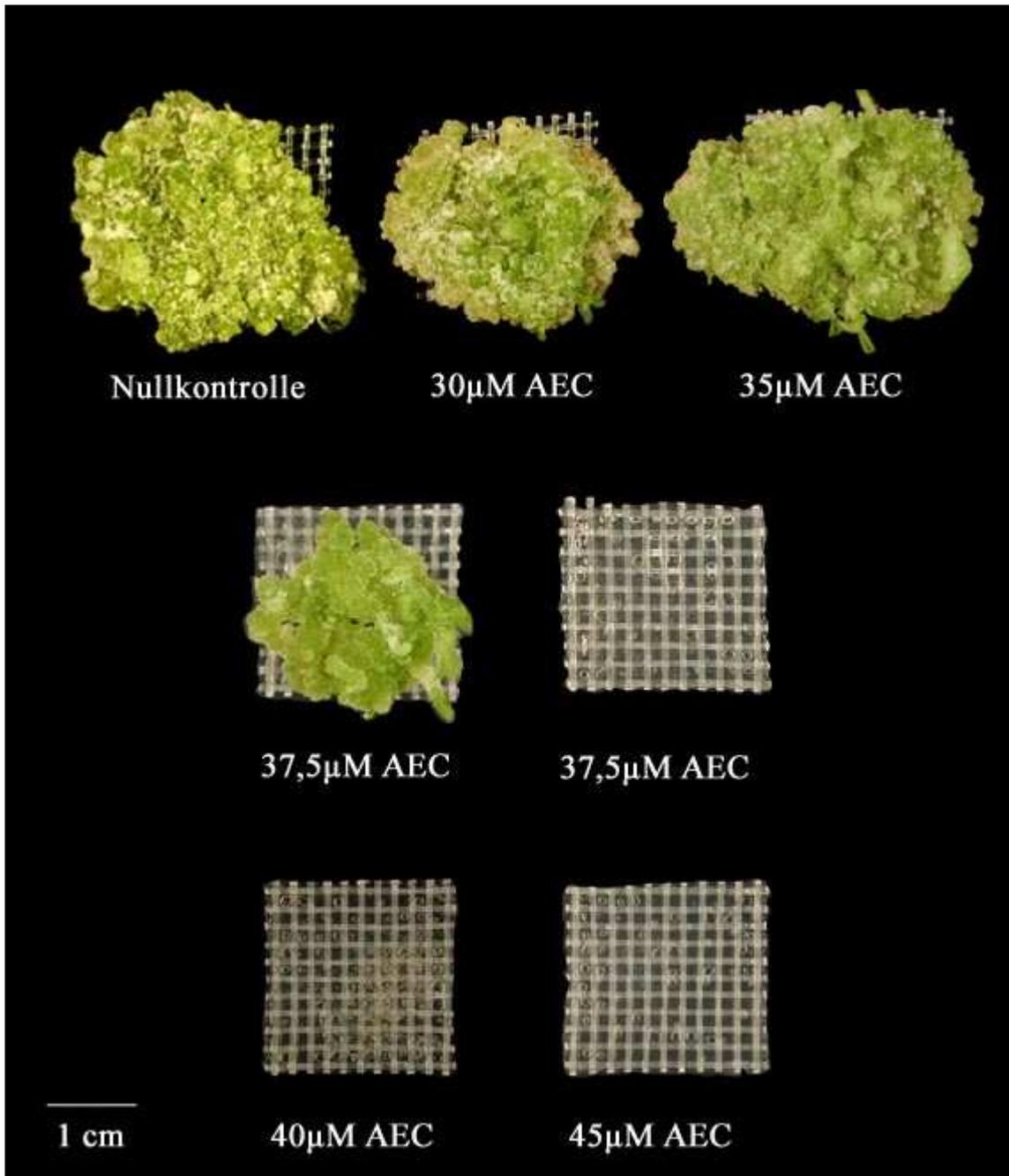


### 3.2.1.1.2 Selektionsbedingungen bei Protoplasten/Mikrokolonien

Für Testreihen von aus Protoplasten regenerierten Zellkolonien mit AEC als selektivem Hemmstoff wurde ein Konzentrationsbereich von 30-45  $\mu\text{M}$  (0/30/35/37,5/40/45  $\mu\text{M}$ ) gewählt. Bereits bei Konzentrationen ab 40  $\mu\text{M}$  AEC war ein Absterben der Mikrokolonien in der ersten Woche nach Zugabe des Hemmstoffs zu beobachten. Bei Konzentrationen bis 35  $\mu\text{M}$  AEC war kein Unterschied zur 0-Kontrolle festzustellen. Der effektive Bereich zur Selektion plastidärer Transformanten sollte sich daher zwischen 35 und 40  $\mu\text{M}$  AEC bewegen. In Abb. 3.16 wird deutlich, dass selbst bei einer Konzentration von 37,5  $\mu\text{M}$  AEC große Unterschiede zwischen den in Netzen eingebetteten Mikrokolonien bestehen. Zur Selektion von plastidären Transformanten wurde eine Konzentration von 37,5  $\mu\text{M}$  AEC gewählt.

---

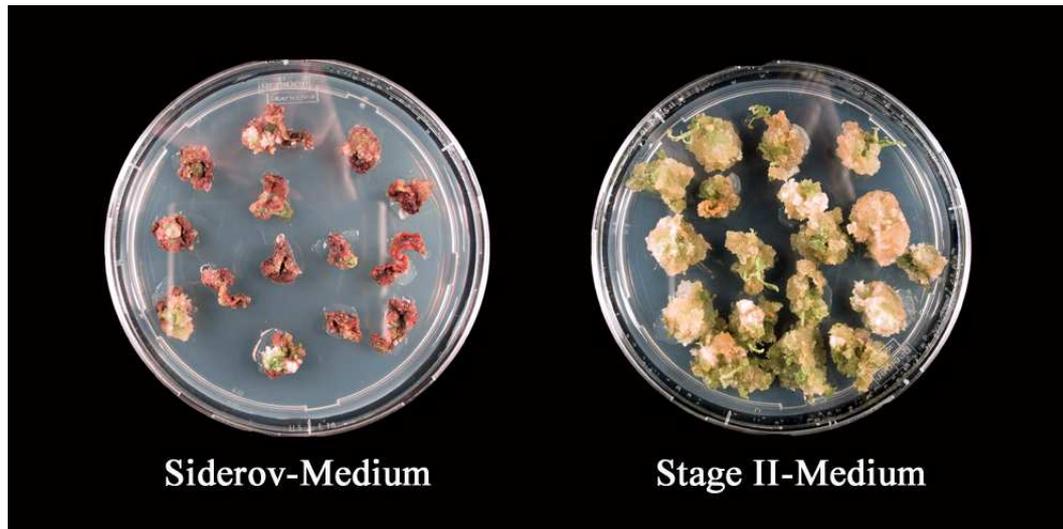
**Abb. 3.16 Hemmwirkung von AEC auf die Regenerationsfähigkeit von Tabakprotoplasten.** Isolierte Tabakprotoplasten wurden in Alginatnetze eingebettet und für 14 Tage in flüssigem Regenerationsmedium (F-PCN) kultiviert. Danach wurden die Netze zur weiteren Regeneration auf RMOP-Festmedium gelegt. Nach einer Regenerationszeit von 5 Wochen unter selektiven Bedingungen wurde die Hemmwirkung dokumentiert.



### 3.2.1.2 Selektionsbedingungen bei Kartoffel

Zu Beginn der Selektionsversuche mit AEC als Hemmstoff stellte sich heraus, dass das von Sidorov et al. (1999) für die Kartoffellinie FL1607 optimierte einstufige Regenerationsmedium nicht für *Solanum tuberosum* L. var. Walli geeignet ist. Nach mehreren Versuchen zur Regenerationsfähigkeit von Kartoffelblattstücken wurde ein zweistufiges Regenerationsmodell verwendet. In den ersten zwei Wochen wurde das kallusinduzierende „Stage-I-Regenerationsmedium“ verwendet. Danach das sprossinduzierende „Stage-II-Medium“ (siehe Kapitel 2.9.3). Abb. 3.17 zeigt einen Vergleich der Regenerations-

eigenschaften des einstufigen „Sidorov-Mediums“ mit dem zweistufigen „Stage-Regenerationsmedium“.



**Abb. 3.17 Vergleich zwischen Regenerationsmedien bei *Solanum tuberosum* L. var. Walli.** In der linken Petrischale wurden Kartoffelblattstücke auf „Sidorov-Medium“ regeneriert, in der rechten zuerst zwei Wochen auf kallusinduzierenden „Stage-I“-Medium, danach auf sprossinduzierenden „Stage-II“-Medium. Dargestellt sind Regenerate nach einer 4 wöchigen Regenerationszeit.

In Testreihen zur Regenerationsfähigkeit von Kartoffelblattstücken unter selektiven Bedingungen wurde ein Konzentrationsbereich von 2,5-40  $\mu\text{M}$  (2,5/5/7,5/10/12,5/15/40) AEC gewählt. Es wurden ca. 0,8 cm  $\varnothing$  große Blattstücke ausgeschnitten und auf selektivem Regenerationsmedium aufgelegt. Bereits bei einer AEC-Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  war das Blattstück braun verfärbt. Es erfolgte aber eine Kallus- und Sprossbildung. Bis zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  AEC erfolgte eine Sprossbildung. Bei einer AEC-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  war eine Kallusbildung nur noch an den Blatträndern zu beobachten. Bereits ab Konzentrationen von 12,5  $\mu\text{M}$  ist ein Absterben der Blattstücke zu beobachten. Damit sind Kartoffelblattstücke wesentlich sensitiver gegenüber AEC als Tabakblattstücke. Zur Selektion von plastidären Transformanten wurden AEC-Konzentrationen von 5-7,5  $\mu\text{M}$  ausgewählt. In Abb. 3.15B ist die Wirkung von AEC auf die Regenerationsfähigkeit von Kartoffelblattstücken dargestellt.

### 3.2.2 Analyse der plastidären Transformanten

In unserer Arbeitsgruppe werden Plastidentransformationen seit vielen Jahren routinemäßig durchgeführt. Der Aufbau der Transformationskassetten (siehe Abb. 2.5 und 2.6) orientiert sich strukturell an die in unserer Arbeitsgruppe entwickelten plastidären Transformationsvektoren. Das heißt, sie enthalten neben dem einzuführenden Transgenen (in diesem Fall das *dhdps-r1*-Gen und das *aadA*-Gen als zusätzlichen Selektionsmarker),

plastidäre Regelemente sowie homologen Flanken zum gezielten Einbau der Transformationskassette ins Plastidengenom durch homologe Rekombination. Die homologen Flanken stammen aus *Nicotiana tabacum* und liegen in einem „inverted repeat“ zwischen den Genen *rpl32* und *trn* des Plastidengenoms. Die Gene *dhdps-r1* und *aada* wurden bei den Transformationskassetten pHoDh1a und pHoDh2b unter Kontrolle des 16S-Promotors gestellt. Als 5'-Bereich wurde für die Kassette pHoDh2b ein *psbA*-UTR verwendet. Für die Kassette pHoDh1a wurde ein *psbA*-UTR und ein synthetisches 26 bp Fragment, dessen Sequenz aus der 5'-Region des (monocistronischen) *rbcL*-Operons von Tabak abgeleitet ist, benutzt. Der 3'-Bereich stammt entweder aus dem *Chlamydomonas rbcL*-Operon oder aus dem *rbcL*-Gen von *Nicotiana tabacum*. Die Komponenten stammen aus den Transformationsvektoren pKCZ und pUC16S5'psbA(orig)uidA3'rbcL (siehe Kapitel 2.3) und wurden schon bei zahlreichen Plastidentransformationen erfolgreich verwendet (pers. Mitteilung Z. Zhouong).

Mit den Konstrukten pHoDh2b und pHoDh1a wurden Transformationsexperimente bei Tabakblättern, Tabakprotoplasten und Kartoffelblättern durchgeführt. Die Selektion der potentiellen plastidären Transformanten erfolgte zum einen auf Spectinomycin/Streptomycin und zum anderen auf AEC. Insgesamt konnten 86 resistente Linien selektiert werden. In Tab. 3.9 sind alle selektierten Linien dargestellt.

**Tab. 3.9 Darstellung der selektierten plastidären Transformanten**

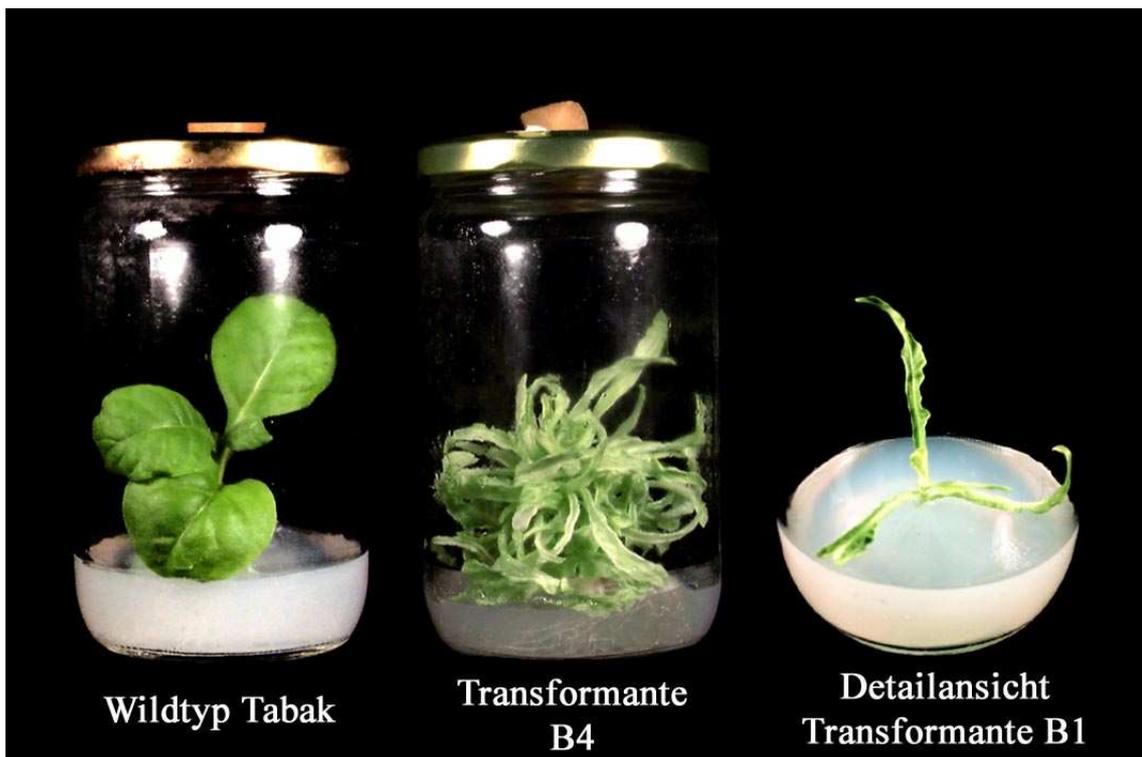
	Tabak				Kartoffel			
	Selektion mit Spec.	plastidäre Integration	Selektion mit AEC	plastidäre Integration	Selektion mit Spec	plastidäre Integration	Selektion mit AEC	plastidäre Integration
Blattstücke	34	8	48	3	(-)	(-)	1	(-)
Protoplasten	keine Transf.	(-)	3	(-)	keine Transf.	(-)	keine Transf.	(-)

Alle selektierten plastidären Linien wurden mit der Transformationskassette pHoDh2b transformiert. Mit der Transformationskassette pHoDh1a konnten keine Transformanten selektiert werden.

### 3.2.2.1 Analyse Spectinomycin-resistenter Linien

Es wurden insgesamt drei unabhängige Transformationsexperimente mit der resistenzvermittelnden Transformationskassette pHoDh2b durchgeführt. Bei drei „particle gun“-Experimenten wurden insgesamt 27 Tabakblätter mit dem Transformationsvektor

pHoDh2b beschossen. Mit Spectinomycin (500 mg/l) selektierte Linien konnten ab der sechsten Regenerationswoche identifiziert werden. Die Mehrzahl der identifizierten Sprossen wurde zwischen der 8. und 12. Woche selektiert. Es konnten nach über 4-5 Monaten Sprossen selektiert werden, die sich als Plastidentransformanten herausgestellt haben (z.B. B101, B104). Viele Linien waren bereits nach der Selektion abgestorben und konnten nicht molekularbiologisch charakterisiert werden. Die hier beschriebenen Analysen wurden mit Pflanzenmaterial durchgeführt, das aus dem ersten Regenerationszyklus stammt. Als Beispiel sind in Abb.3.18 die Linien B1 und B4 im ersten Zyklus dargestellt.



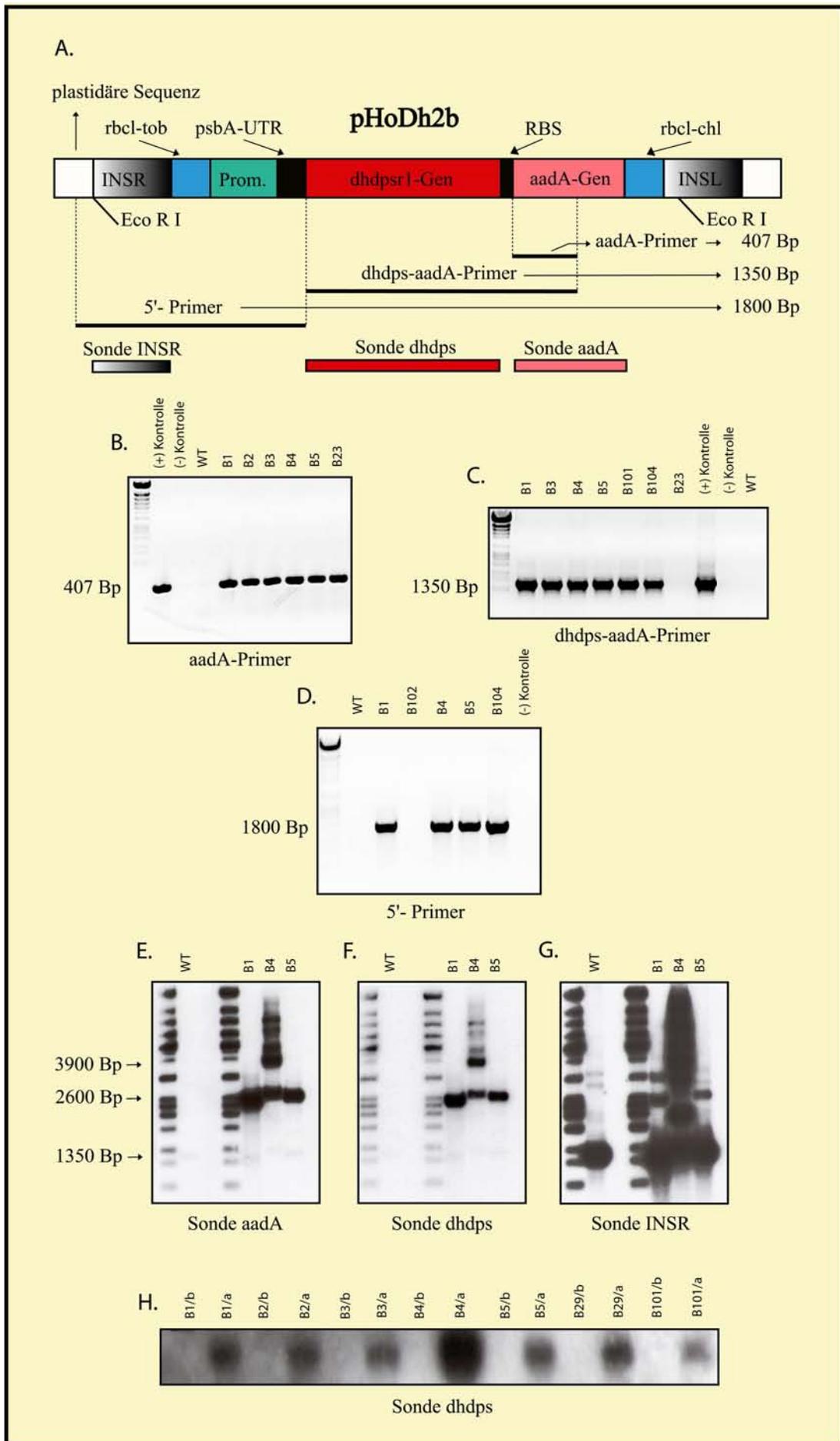
**Abb. 3.18 Plastidäre DHDPS-Tabaktransformanten und Tabakwildtyp-Pflanze.** Die plastidären DHDPS-Transformanten wurden auf auf RMOP-Medium mit einer Spectinomycin-konzentration von 500 mg/l selektiert. Die selektierten Klone wurden nach dem ersten Zyklisierungsschritt auf B5-Medium + 500 mg/l Spectinomycin weiterkultiviert.

Die Blätter der transformierten Pflanzen waren lanzettartig verkleinert und besaßen eine blassgrüne Farbe mit weißen Bereichen. Das Wachstum war langsam und der Wuchs verkümmert. Weitere Zyklisierungsschritte waren nur bedingt möglich, da einige Linien in der dritten Zyklisierung abgestorben waren. In Abb. 3.19 sind das Analyseschema und Ergebnisse von ausgewählten Linien dargestellt. Die PCR-Analysen mit den Primerkombinationen *aadA*, *dhdps-aadA* dienten dem Vorscreening der selektierten Linien. Bei allen getesteten Linien wurde das *aadA*-Gen nachgewiesen. Bei acht Linien erfolgte ein positiver PCR-Nachweis bezüglich der Integration der Transgene *dhdps* und *aadA*. Zum Nachweis der plastidären Integration der Transformationskassette wurde eine

Primerkombination gewählt, bei der ein Primer im 5'-Bereich außerhalb des Transformationsvektors und der andere Primer innerhalb des *dhdps*-Gens liegt. Alle *dhdps*-*aadA*-positiven Linien sind an der korrekten Stelle ins Tabak-Plastom integriert worden. Dies bestätigen auch Southern-Analysen der Linien B1, B4 und B5 (Abb. 3.19E-F). Die Southern-Analysen wurden nach dem in Kapitel 2.5.3 beschriebenen Protokoll mit 3 µg Gesamt-DNA je Spur durchgeführt. Die DNA wurde mit *Eco* RI geschnitten. Die Membran wurde nacheinander mit den Sonden „*aadA*“, „*dhdps*“ und „*INSR*“ hybridisiert. Das Restriktionsenzym *Eco* RI schneidet in den homologen Flanken der Transformationskassette. Bei einer korrekten Integration des Konstruktes in das Plastidengenom ist, bei einer Hybridisierung mit der Sonde *aadA* und der Sonde *dhdps* ist eine Bande von 2684 Bp zu erwarten. Bei der WT-Kontrolle sollte kein Signal vorhanden sein. Die Hybridisierung mit der Sonde *INSR* sollte ein zusätzliches Wildtyp-Signal in der Größe von 1350 Bp zeigen. Bereits während der Regenerationsphase der Linien hatte sich angedeutet, dass die Transformanten den homoplastomischen Zustand nicht erreichen, da ihr Wuchs sogar im heteroplastomischen Zustand stark beeinträchtigt war. Eine Hybridisierung der Linien B1, B4 und B5 mit der Sonde *INSR* bestätigt dies. Neben dem erwarteten Transformationssignal von 2684 Bp ist ein zusätzliches WT-Signal von 1350 Bp vorhanden.

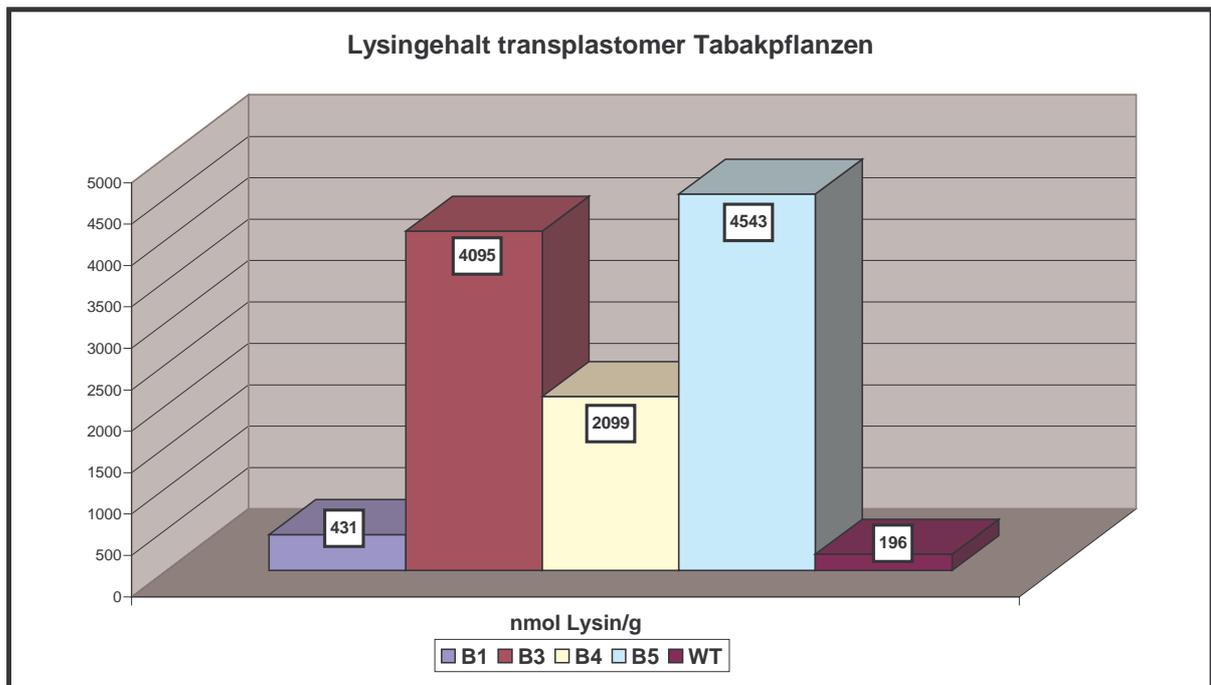
---

**Abb. 3.19 Analyse Spectinomycin-resistenter plastidärer DHDPS-Linien.** A. Schematische Darstellung der Primerkombinationen, der Gensonden und der Restriktionsschnittstellen zur Analyse plastidärer Transformanten. B-D. PCR-Analysen ausgewählter plastidärer Transformanten mit verschiedenen Primerkombinationen. E-G. Southern-Hybridisierung ausgewählter Linien mit den Gensonden *aadA*, *dhdps* und *INSR*. H. Northern-Hybridisierung plastidärer Transformanten mit der Gensonde *dhdps*. a: auf spectinomycinhaltigem Regenerationsmedium regenerierte Linien. b: nach Selektion auf spectinomycinhaltigem Regenerationsmedium Weiterkultur auf spectinomycinfreiem Regenerationsmedium.



Zur Untersuchung der Transkriptmenge wurden 5 µg Gesamt-RNA je Spur eingesetzt. Die Membran wurde mit der Sonde dhdps hybridisiert. Als Vergleich zu den auf Spectinomycin selektierten Transformanten B1-B5 und B101 wurden die gleichen Linien auch auf spectinomycinfreiem Medium kultiviert. In Abb.3.18H ist zu erkennen, dass alle auf spectinomycinhaltigem Regenerationsmedium regenerierten Linien ein deutliches Hybridisierungssignal von unterschiedlicher Stärke aufweisen. Bei allen Klonen, die nach anfänglicher Selektion auf auf spectinomycinhaltigem Regenerationsmedium auf spectinomycinfreiem Medium weiterkultiviert wurden, ist kein Hybridisierungssignal vorhanden. Liegt bei Plastidentransformanten keine homoplastomische Integration vor, wird bei fehlendem Selektionsdruck - insbesondere dann, wenn das Transgen einen negativen Selektionsdruck ausübt - das Transgen sehr schnell eliminiert. Der Wuchs und der Habitus der „ehemaligen“ transgenen Linien war von Wildtyp-Pflanzen nicht zu unterscheiden.

Zur Bestimmung des Lysingehalts der plastidären Transformanten wurden die freien Aminosäuren mittels Phenylisothiocyanat (PITC) derivatisiert. Die dabei entstehenden Phenylthiocarbamoyl-(PTC)-Derivate wurden durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt und bei 254nm detektiert. Der Aminosäuregehalt wurde anhand der Flächen der durch den UV-Detektor erfassten Peaks ermittelt. Die Analyse des Gehaltes an freiem Lysin der auf Spectinomycin selektierten plastidären Transformanten B1, B3, B4 und B5 ist in Abb. 3.20 dargestellt.



**Abb. 3.20 Lysingehalt transplastomer Tabakpflanzen.** Als Pflanzenmaterial wurde Blattmaterial von ca. 8-10 Wochen alten Transformanten aus dem ersten Regenerationszyklus verwendet. Die WT-Kontrollpflanze war ca. 4 Wochen alt.

Bei allen untersuchten Transformanten ist eine deutliche Steigerung des Lysingehaltes im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle festzustellen. Für die breite Streuung (2 bis 23-fache Erhöhung des freien Lysingehaltes) zwischen den transgenen Linien könnte eine unterschiedliche Kopienzahl des Transgens innerhalb des plastidären Genoms verantwortlich sein. Ein weiterer Grund könnte in einer ungleichen Segregation begründet sein, d.h. es liegen Wildtypareale und Areale, die das Transgen enthalten, innerhalb einer Pflanze vor.

### 3.2.2.2 Analyse AEC-resistenter Linien

Es wurden insgesamt sechs unabhängige Transformationsexperimente mit der resistenzvermittelnden Transformationskassette pHoDh2b durchgeführt. Bei vier „particle gun“-Experimenten wurden insgesamt 18 Tabakblätter und 18 Kartoffelblätter mit dem Transformationsvektor pHoDh2b beschossen. Bei dem Transformationsexperiment mit der PEG-Methode wurden die transformierten Tabakprotoplasten in 9 Kunststoffnetze eingebettet. Die Zugabe des Hemmstoffs AEC erfolgte im 8-16 Zellstadium der Mikrokolonien nach ca. 7-12 Tagen Regeneration im Flüssigmedium. Die AEC-Konzentration bei der Selektion von aus Protoplasten regenerierten Mikrokolonien war 37,5  $\mu\text{M}$ . Der Konzentrationsbereich bei der Selektion von transformierten Kartoffelblattstücken lag zwischen 5-7,5  $\mu\text{M}$  AEC. Bei transformierten Tabakblattstücken wurde die AEC-Konzentration alle 10-12 Tage stufenweise angepasst (55/45/40/35  $\mu\text{M}$  AEC). Ohne diese stufenweise Absenkung wäre es nicht möglich, die „falsch positiven“ von den Transformanten zu unterscheiden. Bei einer Beibehaltung der Anfangskonzentration ist die toxische Wirkung von AEC zu hoch, mit der Folge, dass alle Blattstücke absterben. Bei einer geringeren Anfangskonzentration als 55  $\mu\text{M}$  AEC ist der Selektionsdruck nicht ausreichend.

Ab der sechsten Regenerationswoche konnten AEC resistente Sprossen aus Transformationen mit Tabakblattstücken identifiziert werden. Die Mehrzahl der insgesamt 49 Sprossen wurden zwischen der 6. und 9. Woche selektiert.

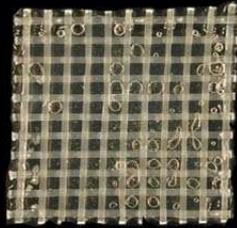
Aus einer PEG-Transformation mit Tabakprotoplasten konnten ab der 6. Woche AEC-resistente Kalli identifiziert werden. Die Kalli wurden vereinzelt und auf selektivem Regenerationsmedium weiterkultiviert. Nach weiteren 3-4 Wochen konnten aus den Kalli 3 Sprosse selektiert werden. Die restlichen Kalli sind abgestorben. In Abb. 3.21 ist der plastidäre Klon C48 sowie die Selektion von Transformanten aus Blattstücken und Mikrokolonien dargestellt.

Nach einer Regenerationszeit von 12 Wochen konnte ein AEC-resistenter Kartoffelspross aus einer „particle gun“-Transformation mit dem Transformationsvektor pHoDh2b selektiert werden. Der Spross wurde auf selektivem Medium weiterkultiviert.

---

**Abb. 3.21 Selektion AEC-resistenter Linien.** A. Wachstum AEC-resistenter Mikrokolonien auf selektivem Regenerationsmedium aus PEG-Transformationen im Vergleich zur WT-0-Kontrolle. B. AEC-resistente Sprosse aus Blattstücken. C. Detailansicht AEC-resistenter Sprosse aus Blattstücken. D. Vergleich einer AEC-resistenten plastidären Transformante mit einer WT-Kontroll-Pflanze.

A.



WT-Kontrolle  
+37,5µM AEC

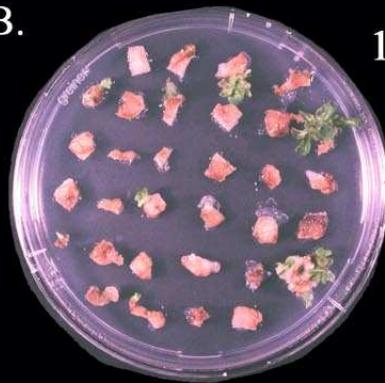


auf 37,5µM AEC  
selektierte Kolonien



Nullkontrolle

B.



1 cm



auf AEC selektierte Plastidentransformanten

C.

Detailansicht



D.



Wildtyp

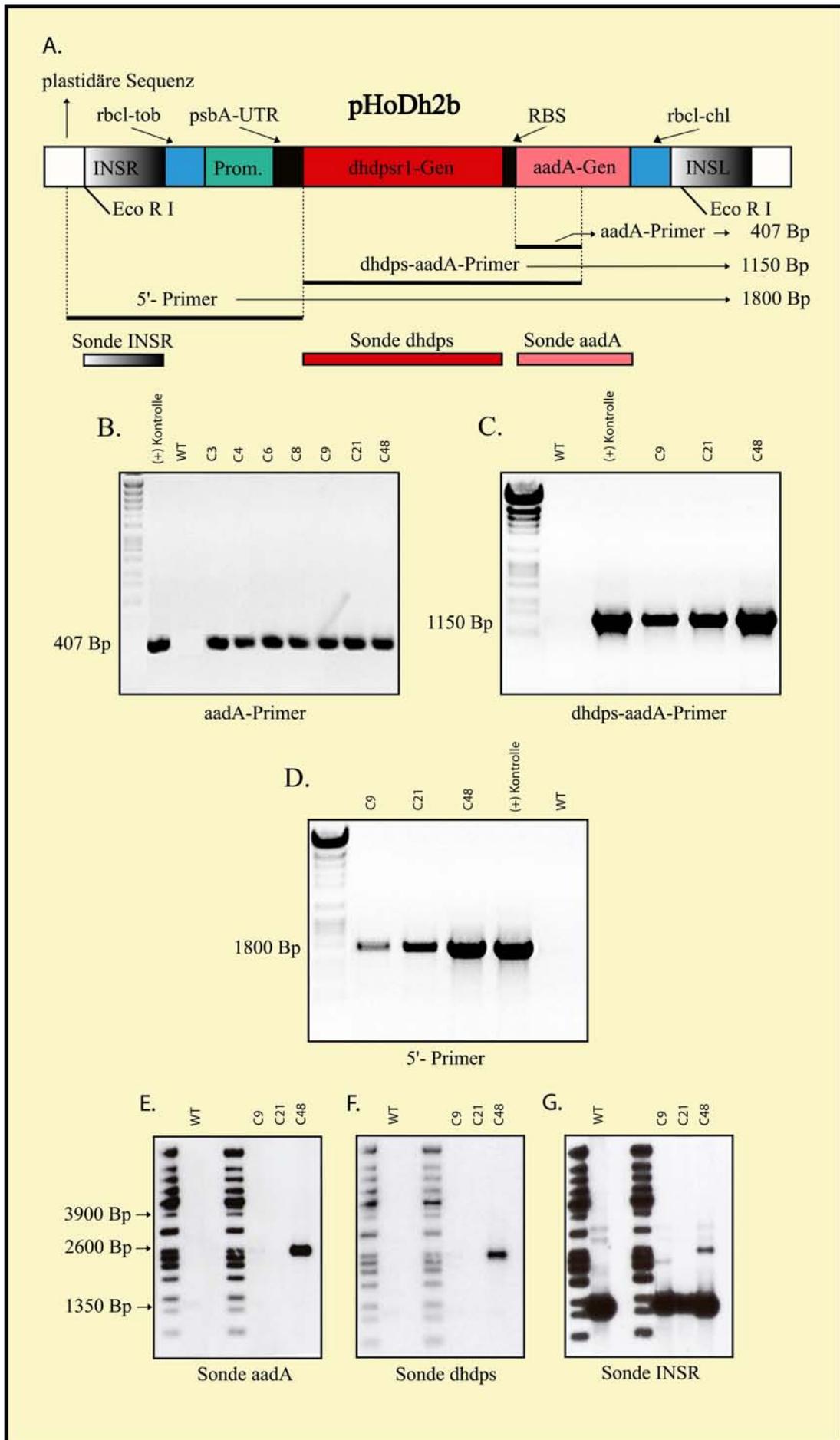


Plastidentransformante  
C-48

Sobald genügend Pflanzenmaterial für eine DNA-Isolierung vorhanden war, wurde DNA isoliert und die Integration der Transgene *aadA* und *dhdps* per PCR getestet. Ähnlich wie bei den auf Spectinomycin selektierten Linien wurde das Pflanzenmaterial der ersten Zyklisierung für die molekularbiologische Analyse benutzt. Das Analyseschema ist identisch zu dem, welches für die Spectinomycin-resistenten Linien benutzt wurde. Die PCR-Analysen der drei Sprossen die aus der PEG-Transformation von Tabakprotoplasten hervorgegangen sind sowie des resistenten Kartoffelklons waren negativ. Bei den aus „particle gun“-Transformationen hervorgegangenen Tabaklinien aus Blattstücken konnten 3 Linien identifiziert werden, bei denen die Transgene *dhdps* und *aadA* gemeinsam integriert worden sind. Alle anderen 49 Sprossen waren negativ. Bei den Linien C9, C21 und C48 konnte per PCR eindeutig eine plastidäre Integration nachgewiesen werden. Die nachfolgende Southern-Analyse konnte nur bei der Linie C48 eine plastidäre Integration belegen. Das Transgen ist bei den Linien C9 und C21 offenbar nur in sehr wenigen Kopien des Plastidengenoms vorhanden und liegt daher unter der Nachweisgrenze. Die Empfindlichkeit der durchgeführten Southern-Analyse war nicht ausreichend, um eine oder wenige Kopien eines Gens nachzuweisen. Dies wurde auch bei einer Southern-Hybridisierung mit der „*dhdps*“-Sonde deutlich (Abb. 3.22 F). Das „normale“ *dhdps*-Gen im Kerngenom von Tabak konnte unter diesen Versuchsbedingungen ebenfalls nicht detektiert werden. Abb. 3.22 zeigt die Analyse der AEC resistenten Klone, die aus der Transformation von Tabakblattstücken mit dem Transformationsvektor pHoDh2b erhalten werden konnten.

---

**Abb. 3.22 Analyse AEC-resistenter plastidärer DHDPS-Linien.** A. Schematische Darstellung der Primerkombinationen, der Gensonden und der Restriktionsschnittstellen zur Analyse plastidärer Transformanten. B-D. PCR-Analysen ausgewählter plastidärer Transformanten mit verschiedenen Primerkombinationen. E-G. Southern-Hybridisierung ausgewählter Klone mit den Gensonden „*aadA*“, „*dhdps*“ und „*INSR*“.



Bei der Analyse der Transkriptmenge zeigten weder die auf AEC-enthaltendem noch die auf AEC-freiem Medium regenerierten Linien C9, C21 und C48 bei einer Hybridisierung mit der „dhds“-Sonde ein Signal.

Die biochemische Analyse des freien Lysingehaltes konnte nur bei der Linie C21 durchgeführt werden. Bei den Linien C9 und C48 war zum Zeitpunkt der Analyse nicht genügend Pflanzenmaterial vorhanden. Linie C21 zeigte mit 226,8 nmol Lysin/g Frischgewicht nur eine geringfügige Erhöhung gegenüber dem Wildtyp mit 196 nmol Lysin/g Frischgewicht.

## 4 Diskussion

### 4.1 Mitochondrientransformation

Seit den ersten Mitochondrientransformationen bei *Saccharomyces cerevisiae* (Johnston et al. 1988) und *Chlamydomonas reinhardtii* (Randolph-Anderson et al., 1993) gibt es weltweit zahlreiche Bestrebungen, auch die Mitochondrien höherer Pflanzen zu transformieren. Während es nach den ersten Plastidentransformationen bei *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton et al., 1988; Blowers et al., 1989) gelungen ist, auch Plastiden höherer Pflanzen zu transformieren (Svab et al., 1990), konnte man bei der Transformation von pflanzlichen Mitochondrien keine Erfolge verzeichnen. Die ersten Organelltransformationen wurden bei Mitochondrien und bei Plastiden durch Kurieren von Defektmutanten erzielt. Bei der ersten Plastidentransformation einer höheren Pflanze wurde ein mutantes, spectinomycin- und streptomycinresistenz verleihendes 16S rDNA-Fragment in die Chloroplasten von Tabak inseriert. Eine Verbesserung der Transformationseffizienz konnte durch Verwendung des selektierbaren Markers *aadA* zunächst bei *Chlamydomonas reinhardtii* (Goldschmidt-Clermont, 1991) und dann bei Tabak (Staub und Maliga, 1992) erreicht werden.

Mitochondriale Defekte führen, im Gegensatz zu plastidären Defekten, bei höheren Pflanzen in den meisten Fällen zur Letalität, da sie häufig die Gene der Atmungskette betreffen. Es sind zur Zeit keine geeigneten mitochondrialen Mutanten bei dicotylen Pflanzen verfügbar, die sich als Ausgangsmaterial für Mitochondrientransformationen nutzen lassen. Mitochondriale Gene, die im Zusammenhang mit der Blütenentwicklung oder dem *cms*-System stehen, sind zwar zum Teil gut charakterisiert (z.B. Kofer et al. 1991), sind aber als selektierbarer Marker nicht nutzbar. Das vegetative Wachstum dieser Mutanten unterscheidet sich nicht von Wildtyp-Pflanzen. Möglicherweise sind die von Havey et al. (2002) identifizierten mitochondrialen MSC-Phänotypen bei Gurke geeignete Kandidaten für eine mitochondriale Transformation. Die während der „in vitro“-Kultur mutierten Pflanzen weisen einen mosaikartigen Phänotyp auf, der als selektiver Marker nutzbar wäre. Es ist aber noch unklar, ob dieser Phänotyp, der durch mitochondriale Deletionen hervorgerufen wird, stabil weitervererbt wird. Neuere Untersuchungen bei vier unterschiedlichen MSC-Typen deuten darauf hin, dass zahlreiche Deletionen innerhalb des mitochondrialen Genoms für den mosaikartigen Phänotyp verantwortlich sind. Einheitliche Polymorphismen, die für alle MSC-Typen gelten, sind nicht beschrieben worden (Bartoszewski et al. 2004).

In dieser Arbeit wurden zwei Strategien zur Transformation von Mitochondrien höherer Pflanzen entwickelt. Zum einen wurden in Anlehnung an die Erfolge bei

Plastidentransformationen resistenzverleihende Markergene eingesetzt. Bei Integration der Markergene in das Mitochondriengenom sollten die zur Selektion benutzten Antibiotika entgiftet werden. Zum anderen wurde ein mitochondrienspezifisches Transformationssystem entwickelt, bei dem ein mutiertes mitochondriales Gen-Fragment der Atmungskette als Transformationsvektor verwendet wurde. Die eingefügten Mutationen sollen zu Resistenzen gegenüber mitochondrialen Inhibitoren führen. In der weiteren Diskussion wird versucht, anhand der Versuchsergebnisse zu klären, inwieweit sich das bei Plastidentransformation erfolgreich angewendete Transformationssystem auf die Mitochondrien übertragen lässt oder ob der mitochondrienspezifische Ansatz bessere Voraussetzungen für eine erfolgreiche Mitochondrientransformation bietet.

#### 4.1.2 Transformationsmethode

Die meisten aus der Literatur bekannten Organelltransformationen wurden mit der biolistischen Methode durchgeführt. Mit der in dieser Arbeit verwendeten Bio-Rad-Gen-Kanone lassen sich aufgrund der vielen Einstellungs- und Variationsmöglichkeiten sehr gute Transformationseffizienzen bei unterschiedlichen pflanzlichen Gewebearten erzielen. Die ersten Mitochondrientransformationen bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Chlamydomonas reinhardtii* wurden mit Mikroprojektilen von 1µm Durchmesser erreicht. Aufgrund der guten Ergebnisse bei Plastidentransformationen und der starken Variabilität in der Größe der Tabakmitochondrien (7-11 µm im Durchmesser, bei 1-35 µm Länge, Sato et al. 1993) wurden Goldpartikel von 0,6µm verwendet. Als Alternative zur „particle gun“ wurde die PEG-Methode verwendet. Mit dieser Methode konnten 1993 Plastiden höherer Pflanzen transformiert werden (Golds et al.). Seitdem wird sie routinemäßig in unserer Arbeitsgruppe angewendet. Die durchschnittliche Transformationseffizienz (Frequenz transformierter Kolonien) beträgt ca.  $2,5 \times 10^{-5}$  (O'Neill et al., 1993, Koop und Kofer, 1995, Kofer et al., 1998b) Sie liegt damit deutlich über den Transformationseffizienzen ( $7,3 \times 10^{-7}$ ) der ersten Mitochondrientransformation bei *Chlamydomonas reinhardtii*, die mit der biolistischen Methode durchgeführt wurde (Randolph-Anderson et al., 1993). Es sollte somit möglich sein, sowohl mit der PEG-Methode als auch der biolistischen Methode Mitochondrien höherer Pflanzen zu transformieren. Wie die Ergebnisse in Kapitel 3.1.2 zeigen, konnte mit der „particle gun“ eine weitaus größere Anzahl potentieller Transformanten erzielt werden als mit der PEG-Methode. Nur ca. 2% aller selektierten Klone wurden mit der PEG-Methode transformiert. Es erscheint somit sinnvoll, die biolistische Methode für weitere Versuche zur Mitochondrientransformation zu verwenden.

### 4.1.3 Auswahl des Zielgewebes

Über die Struktur, Größe und Variabilität der Mitochondriengenome bei höheren Pflanzen gibt es zahlreiche Untersuchungen (z.B. Bendich 1987). Viele stehen in Zusammenhang mit dem *cms*-System, dem wichtigsten Sterilitätssystem zur Herstellung von Hybridsaatgut. Leider lassen sich nur wenige aktuelle Angaben über die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle und den Genomgehalt der Mitochondrien bei unterschiedlichen Gewebearten finden. Bendich and Gauriloff (1984) beschreiben bei *Curcubitaceae* eine Mitochondrienanzahl von 370-1100 pro Zelle (Blatt/Meristem). Das in der Regel sehr variable, aus mehreren ‚subcircles‘ zusammengesetzte Mastergenom der Mitochondrien kann dabei eine Kopienzahl von bis zu 300 je Mitochondrium erreichen (Ward et al., 1981; Pearson et al., 1974). Untersuchungen bei Erbse zeigen sehr unterschiedliche Kopienzahlen der Mitochondriengenome in Abhängigkeit von der Gewebeart. Während sich in Embryozellen die höchsten Kopienzahlen (410) finden lassen, sind im Blattgewebe nur 260 und in den Sprossen und Wurzeln nur 140 Kopien vorhanden. Bei in Dunkelheit kultivierten Sprossen sank die Anzahl der Mitochondriengenome auf 80 Kopien je Zelle ab (Lamppa und Bendich, 1984). Bei Reis konnten Suzuki et al. (1996) zeigen, dass meristematisches Gewebe der Wurzelspitze einen 2,5-fachen höheren mtDNA-Gehalt besitzt als das ausdifferenzierte Wurzelgewebe. Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Zellzyklus beim Antherengewebe von *Chara vulgaris* L. zeigen, dass mit Zunahme der Teilungsaktivität die Größe und die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle kontinuierlich vom 4-Zell bis zum 32-Zellstadium um das ca. 2,5-fache abnimmt (Kwiatkowska, 1981).

Was sind unter diesen Voraussetzungen für die Transformation von pflanzlichen Mitochondrien die geeigneten Gewebearten? Sind viele kleine teilungsaktive mtDNA-reiche Mitochondrien, beispielsweise aus Suspensionskulturen, besser geeignet als wenige großvolumige, ausdifferenzierte Mitochondrien in Blattzellen? Ist eine schnelle Teilungsrate zu Beginn der Selektion günstiger für eine homochondriomische Integration, oder ist eine langsame Teilungsrate erfolgsversprechender? Da diese Fragen zu Beginn der Experimente nicht beantwortet werden konnten, wurden Suspensionskulturen, Blattgewebe, Protoplasten aus Blattzellen und aus Protoplasten regenerierte Mikrokolonien als Zielgewebe ausgewählt.

Im Laufe der Versuche wurde zusätzlich eine photosynthetisch inaktive Tabak-, ‚Knock-out‘-Mutante (*rpo*-Mutante) verwendet, die keine plastidäre RNA-Polymerase synthetisieren kann. Die kerninduzierte Plastommutante ‚Albostrians‘ der Gerste (Hagemann und Scholz, 1962) ist ebenfalls photosynthetisch inaktiv und inzwischen sehr gut charakterisiert. Die rudimentären Plastiden sind photosynthetisch inaktiv und besitzen nur sehr geringe Spuren von Chlorophyll

(Hess et al. 1992, 1993, 1994a). Die „Transkriptmengen“ der Chloroplasten- und auch der Kerngene sind dabei extrem reduziert (Börner und Hess, 1993, Hess et al., 1994b, 1994c). Die Autoren diskutieren eine Steuerung der Kerngene durch plastidäre Signale. Erste Untersuchungen der mitochondrialen Transkripte der Albostrains-Mutante im Vergleich zu plastidären- und Kerntranskripten wurden von Hedtke et al. (1999) veröffentlicht. Die Daten dokumentieren, dass die mitochondrialen Gene im umgekehrten Verhältnis zu den plastidären- und Kerngenen transkribiert werden. Im Vergleich zu ‚normalem‘ grünen Blattgewebe konnte eine um bis zu 2,5-fach gesteigerte mtRNA-Menge in weißem Blattgewebe gemessen werden. In dem Wurzelgewebe der selben Pflanzen konnten keine Unterschiede der Transkriptmengen festgestellt werden. Um zu testen, ob diese Beobachtungen spezifisch für diese Mutante sind, wurden WT-Sämlinge mit dem Herbizid Norflurazon gebleicht. Die RNA-Analysen der mitochondrialen Gene *cob* und *cox III* zeigten eine deutlich gesteigerte Transkriptmenge, die um das 1,6-fache über der unbehandelten Kontrolle lag. Diskutiert werden mehrere spezifische Signale, die (nur ?) im Blattgewebe aktiv sind und die an der Koordination der Genexpression der drei Genome beteiligt sind. Bei der *rpo*-Mutante des Tabaks liegen keine vergleichbaren Untersuchungen vor. Es ist anhand der Ergebnisse der Albostrains-Mutanten der Gerste aber möglich, dass auch im Blattgewebe der *rpo*-Mutanten ein erhöhter mtDNA-Gehalt vorhanden ist. Somit dürfte eine größere Anzahl an mt-Genomen für eine mitochondriale Integration des Transgens zur Verfügung stehen. Falls die Größe und Anzahl der Mitochondrien pro Zelle vergleichbar mit der einer grünen Blatzelle ist, dürfte das Blattgewebe der *rpo*-Pflanzen als Ausgangsmaterial für Mitochondrientransformationen sehr gut geeignet sein. Ob die Mitochondrien der *rpo*-Suspensionkultur ebenfalls einen höheren Gehalt an mtDNA besitzen als Tabak-Suspensionskultur konnte nicht geklärt werden. Generell zeichnen sich Suspensionskulturen durch eine hohe Anzahl an Mitochondrien sowie einer höheren Teilungsrate der Zellen gegenüber Blattgewebe aus (Håkansson et al., 1990). Die Wachstumsrate der *rpo*-Suspensionkultur lag bei gleichen Wachstumsbedingungen um durchschnittlich ca. 20% höher als die Suspensionskultur des „normalen“-Tabaks. Möglicherweise besitzt die *rpo*-Suspensionskultur eine größere Anzahl aktiver Mitochondrien als die Tabak-Suspensionskultur.

Anhand der erhaltenen potentiellen Mitochondrientransformanten (Kapitel 3.1.2) könnte man zumindest eine der oben gestellten Fragen beantworten: Bei Suspensionskulturen von *Arabidopsis* und *rpo*-Tabak, die mit den Transformationskassetten pUM*anti* II, pUM*myx* II, pUM*glu* II und pUM*arg* II transformiert wurden, konnten keine positiven Transformanten

selektiert werden. Dies spricht dafür, dass im Gegensatz zu den Mitochondrientransformationen bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Chlamydomonas reinhardtii* eine Suspensionskultur unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht für die höheren Pflanzen Arabidopsis und Tabak geeignet ist. Möglicherweise sind die hohen Teilungsraten der Zellen, verbunden mit der geringeren Größe der Mitochondrien, die entscheidenden Faktoren. Bei Transformationen von Blättern, Protoplasten und Mikrokolonien konnten insgesamt 214 potentielle Mitochondrientransformanten selektiert werden (siehe Tab. 3.8). Eine geringe Teilungsrate der Zellen zu Beginn der Selektion könnte für die Integration, Rekombination und Replikation des Transgens günstiger sein als eine sehr hohe Teilungsrate, wie sie für Suspensionskulturen typisch ist.

#### 4.1.4 Aufbau der Transformationsvektoren

Der unterschiedliche Aufbau der mitochondrialen Transformationsvektoren (Abb. 2.2, 2.3, 2.4) ergibt sich aus den beiden beschriebenen Strategien zur Mitochondrientransformation. Während die Markergen-Strategie auf mitochondriale Regelemente zur Transkription des Transgens angewiesen ist, wird bei der mitochondrienspezifischen Methode ein mutiertes Fragmentstück des *cob*-Gens als Transformationskassette verwendet. Die Integration der Transformationskassetten über homologe mitochondriale Flanken in das mitochondriale Genom ist hingegen bei beiden Strategien identisch.

##### 4.1.4.1 Homologe Rekombination

Die Integration von Transgenen in das Kerngenom verläuft zur Zeit noch weitgehend ungerichtet. Die Transformationskassetten werden meistens nicht gezielt an einen ‚stillen Ort‘ im Kerngenom integriert, sondern sie werden zufällig an eine oder mehrere Stellen des Genoms eingebaut. Nachteile einer solchen Integration sind unter anderem ein unkalkulierbarer Dosisseffekt der transgenen Produkte und die (Zer-)Störung von nativen Kerngenen oder Regelementen durch den Transformationsvektor. Bei Organelltransformationen erfolgt der Einbau der Transgene durch eine zielgerichtete Integration von DNA-Fragmenten in das Genom. Bei den ersten Plastiden- und Mitochondrientransformationen von *Chlamydomonas reinhardtii* bzw. *Saccharomyces cerevisiae* wurden Defektmutanten durch Transformation mit einem entsprechenden Wildtyp-Genfragment kuriert. In beiden Fällen wurden Deletionen von 2,5 kB und 2,6 kB innerhalb der organelleigenen Gene *atpB* und *oxi3* durch homologe Rekombination kuriert (Boynton et al., 1988; Johnston et al., 1988). Die Länge der zur Integration benutzten homologen Flanken betrug bei der Mitochondrientransformation im 5'- und 3' Bereich ca. 600 Bp. Wenig später konnte Goldschmidt-Clermont (1991) bei *Chlamydomonas reinhardtii* mit dem selektierbaren

*aadA*-Gen aus *E. coli* erstmals ein Fremdgen durch homologe Rekombination in ein Plastom stabil integrieren. Inzwischen liegen Plastomtransformanten bei Tabak vor, bei denen vier verschiedene Transgene mit über 6,5 kB Größe inseriert wurden (Eibl, 1999). Über die Natur der zur zielgerichteten Integration von DNA-Fragmenten nötigen Rekombinationsereignisse ist noch wenig bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass bei der Organelltransformation die Integration des Transgens durch Rekombinationsereignisse an beiden homologen Flanken erfolgt. Allerdings wäre auch eine Integration des gesamten Vektors über lediglich ein Rekombinationsereignis an einer der beiden Flanken möglich. Jedoch sind entsprechende Transformanten bisher nicht beschrieben worden. Dies könnte daran liegen, dass bei den weiteren Rekombinationsereignissen die Transformationskassette aufgrund der homologen Rekombination zwischen den homologen Flanken wieder deletiert werden kann. Auch eine intermolekulare Rekombination zwischen rekombinanten- und „Wildtyp“-Molekülen (mit zweifachem Rekombinationsereignis) würde zu dem gleichen Ergebnis führen.

Während eine hohe Rekombinationshäufigkeit bei der Mitochondrientransformation nützlich ist, um möglichst schnell einen homochondriomischen Zustand zu erreichen, kann sie sich auch negativ auf die Stabilität der integrierten Transformationskassette auswirken. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 diskutiert wurde, ist es durchaus möglich, dass bei potentiell transformierten Suspensionskulturen die Transformationskassette korrekt integriert wurde. Aufgrund der hohen Teilungsrate der Zellen und einer möglicherweise hohen Rekombinationsrate des Mitochondriengenoms besteht die Gefahr, dass die Transformationskassette herauskombiniert wurde. Bei PCR-Analysen transformierter Suspensionskulturen, die 3 Wochen unter Selektionsdruck kultiviert wurden und im Vergleich zur negativ-Kontrolle ein leicht erhöhtes Wachstum zeigten, konnte kein transformiertes mutiertes *cob*-Gen nachgewiesen werden.

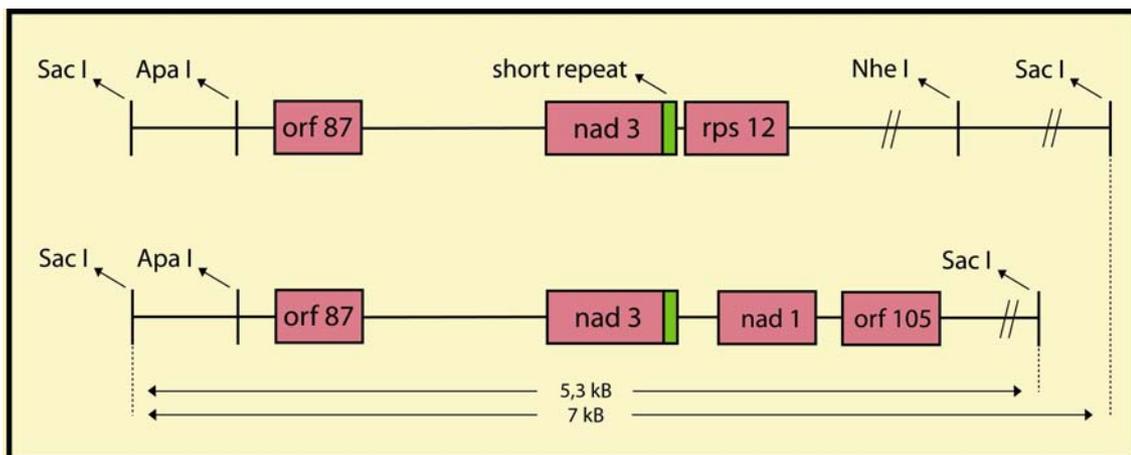
Rekombinationen zwischen endogenen Regelementen und solchen des Transgens wurden von Shikanai et al. (1998) bei Plastidentransformationen beschrieben. Bei einer Inaktivierung des plastidären *ndhB*-Gens durch Insertion einer *aadA*-Kassette, die einen 3'-Bereich aus dem zur Insertionsstelle etwa 12 kB entfernten *psbA*-Gen enthielt, trat eine Inversion des dazwischen liegenden Fragmentes auf. Demgegenüber konnten Zoubenko et al. (1994) keine Rekombinationen zwischen einem endogenen und rekombinanten Promotor beobachten, obwohl das Gen in direkter Nachbarschaft zur Insertionsstelle lokalisiert war. Während bei der mitochondrienspezifischen Methode das zu inserierende *cob*-Gen-Fragment bis auf maximal vier Punktmutationen eine 100%-ige Homologie zum Integrationsort aufweist, werden bei der Markergen-Strategie mitochondriale Regelemente benötigt, die potentiell

mit den nativen Genen rekombinieren können. Aufgrund der fehlenden Charakterisierung homologer Regelelemente zu Beginn der Arbeit und der Gefahr einer ungewollten homologen Rekombination wurden heterologe Regelelemente verwendet.

#### 4.1.4.2 Transformationsvektoren der Markergen-Strategie

##### 4.1.4.2.1 Mitochondrialer Integrationsort

Aufgrund fehlender mitochondrialer Sequenzdaten wurde ein Integrationsort gewählt, der in Zusammenhang mit dem *cms*-System bei Tabak stehen könnte. Gutierrez et al. (1997), konnten bei *Nicotiana sylvestris* zwei Kopien des mitochondrialen Gens *nad3* nachweisen. Interessanterweise liegen beide Gene in unterschiedlichen Genclustern. Das kleinere, 5,3 kB große *Sac*I Fragment beinhaltet den *orf87*, das *nad3*-Gen, das *nad1/A*-Exon und den *orf 105*. Das größere 7 kB große *Sac*I Fragment beinhaltet den *orf87* und das *nad3*-Gen, dann folgt aber ein *rps12*-Exon (Abb 4.1).



**Abb. 4.1 Vergleich von zwei mitochondrialen *orf87/nad3* Genclustern.** Das 6,3 kB große *Apa* I/*Sac* I Fragment des 7 kB-Genclusters, diente als flankierende homologe Sequenz innerhalb der Transformationskassetten der Markergenstrategie. Eingeführt wurden die Promotor-/Markergen-/Terminator-Kassetten in dem nichtkodierenden 3'-Bereich des *rps 12*-Gens an der *Nhe* I-Schnittstelle.

Der *orf87* besitzt starke Homologien zu anderen *orf*'s in unterschiedlichen Pflanzenarten, die in Zusammenhang mit dem *cms*-System stehen. Bei Tabak gibt es noch keine Hinweise, dass der *orf87* am *cms*-System beteiligt ist, da er sowohl in sterilen als auch fertilen Pflanzen vorhanden ist. Es ist aber möglich, dass bestimmte Kerngene (Restorerene) an der Steuerung der cytoplasmatischen männlichen Sterilität bei Tabak beteiligt sind und mit dem *orf87* in Zusammenhang stehen. Eine solche Steuerung ist bei vielen Arten beschrieben worden. In beiden Genclustern werden die Gene kotranskribiert. Auch bei anderen Pflanzenarten werden Kotranskriptionen mitochondrialer Gencluster beschrieben (Wissinger et al., 1988, 1990; Gualberto et al., 1988, 1991; Nakazono et al., 1995). Die Entstehung des kleineren, 5,3 kB großen Clusters ist auf homologe Rekombinationsereignisse während der mitochondrialen

Evolution zurückzuführen. Die *SacI*-Fragmente beider Gencluster sind in allen bisher untersuchten *Nicotiana*-Arten vorhanden. Das größere 7 kB Fragment wird aber mit Ausnahme von *Nicotiana tomentosiformis* in größeren Mengen amplifiziert als das 5,3 kB Fragment (Gutierrez et al., 1997). In dieser Arbeit wurde ein 6 kB großes *Apa I/Sac I* Fragment des 7 kB Genclusters als homologe Flanke der Transformationsvektoren mit den Resistenzgenen *cat*, *bsr* bzw. *hph* verwendet (Abb. 2.3). Als Insertionsort der Resistenzgene wurde eine *NheI*-Schnittstelle im 3'-Bereich des 6 kB Fragmentes ausgewählt. Der Abstand von ca. 2,4 kB vom 3'-Ende des *orf87/nad3/rps12*-Clusters sollte eine Behinderung der Transkription der innerhalb der Gencluster liegenden Gene verhindern. Als Nachteil erwiesen sich aber fehlende Sequenzinformationen im 5'-und 3'-Bereich des *orf87/nad3/rps12*-Clusters, die eine eindeutige Analyse der potentiellen mitochondrialen Transformanten nicht zuließen. Erst nach Sequenzierung eines 5'-Teilbereichs des *orf87/nad3/rps12*-Clusters wurde eine „long-PCR“ zur Analyse der Transformanten möglich. Zusätzlich wurden die Transformationskassetten pBM*hph*-III und pBM*hph*-IV mit verkürzten homologen Flanken (500 und 1000 Bp je Flanke) hergestellt, um eindeutige und PCR-Analysen zu ermöglichen (Abb.2.4).

Bei Transformationen von Blattstücken mit der Transformationskassette pBM*hph* II konnten bei einer Selektion auf Hygromycin 90 Linien identifiziert werden, von denen 23 positiv bezüglich des *hph*-Gens waren. Eine potentielle mitochondriale Integration des Transgens konnte bei 9 Linien mit Hilfe einer „long-PCR“ charakterisiert werden (Abb.3.9). Bei der „long-PCR“ wurde ein Primer aus dem 5'-Bereich außerhalb des *orf87/nad3/rps12*-Clusters und ein Primer innerhalb des *hph*-Gens verwendet. Neben der erwarteten Bande mit einer Fragmentgröße von 5250 Bp sind weitere Banden aufgetreten. Hybridisierungen von „long-PCR“-Fragmenten mit der Sonde „*hph*“ und „Sonde2“, einer Sonde aus dem 3'-Bereich des *orf87/nad3/rps12*-Clusters, konnten eindeutig belegen, dass es sich bei dem 5250 Bp großen Bande um das erwartete Fragment handelt.

Bei Southern-Analysen wurde Gesamt-DNA der potentiellen mitochondrialen Transformanten mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und mit den Sonden „*hph*“ und „Sonde2“ hybridisiert (siehe Abb. 3.10). Die Hybridisierung der mit *Nco I* verdauten DNA mit der „Sonde2“, zeigte bei den transformierten Linien PGM 5, 17, 23, 25, 26 und 101 ein ca. 3,9 kB großes Signal, dass beim Wildtyp und der Linie 106 nicht vorhanden war. Die einzige bekannte *Nco I*-Schnittstelle war innerhalb des *hph*-Gens lokalisiert. Der 3'-Bereich der homologen mitochondrialen flankierenden Sequenzen war 2,1 kB und das mit *Nco I* geschnittene *hph*-Gen ca. 0,6 kB groß. Die Mindestgröße für eine

außerhalb der Transformationskassette liegenden *Nco* I 3'-Schnittstelle wäre demnach ca. 2,7 kB. Bei dem 3,9 kB großen Signal wäre die *Nco* I-Schnittstelle ca. 1,8 kB im 3'-Bereich außerhalb der homologen mitochondrialen flankierenden Sequenzen lokalisiert. Das 3,9 kB große Signal könnte damit auf eine zielgerichtete mitochondriale Integration der Transformationskassette hindeuten. Eine ca. 19 kB große Bande war bei allen Linien und dem Wildtyp vorhanden. Die nächste *Nco* I 5'-Schnittstelle müsste somit ca. 15,1 kB von der *Nco* I-Schnittstelle des *hph*-Gens entfernt sein. Bei der Linie PGM 17 und 25 war außerdem ein ca. 9,8 kB großes Signal vorhanden. Eine zusätzliche Integration der Transformationskassette an einen andern Ort innerhalb des mitochondrialen Genoms, beispielsweise in durch Rekombinationsereignissen entstandenen „subcircles“ kann nicht ausgeschlossen werden. Das Vorhandensein eines ca. 3,4 kB großen Signals bei allen Linien und dem Wildtyp deutet auf einen zusätzlichen Ort innerhalb des mitochondrialen Genoms, in dem der Sequenzbereich der mitochondrialen „Sonde2“ vorhanden sein könnte. Als weitere Erklärung, wäre eine stabile Insertion von mitochondrialer DNA in das Kerngenom denkbar. In diesem Fall müsste der Sequenzbereich der „Sonde2“ stabil in das Kerngenom integriert sein. Das daraus resultierende Hybridisierungssignal würde dann bei allen Linien die gleich Größe besitzen. Eine Integration der Transformationskassette in den 5,3 kB großen *orf87nad3/nad1/orf105* Gencluster wäre zwar generell möglich, aber nicht mit der „Sonde2“ nachzuweisen, da der Sequenzbereich der Sonde nicht in diesem Gencluster vorhanden ist. Eine Integration der Transformationskassette ins Kerngenom kann bei der Erklärung der 3,9 und 9,8 kB großen Signale weitgehend ausgeschlossen werden. Die Integration von Transgenen ins Kerngenom verläuft in der Regel nicht durch gezielte homologe Rekombination durch flankierende Sequenzen, sondern durch eine zufällige Integration an einen beliebigen Ort des Genoms. Die daraus resultierenden Hybridisierungssignale wären bei jeder transformierten Linie unterschiedlich. Alle Analysierten Linien besaßen weitere Hybridisierungssignale von unterschiedlicher Größe. Bei ihnen ist eine zusätzliche Integration der Transformationskassette in das Kerngenom zu vermuten. Die eingesetzte Gesamt-DNA-Menge von 12µg/Spur wurde gewählt, um eine Integration des Transgens in wenigen Kopien des Mitochondriengenoms nachzuweisen und sollte auch zum Nachweis von Kerntransformanten ausreichen.

Bei einer weiteren Southern-Analyse wurden die Linien mit dem Restriktionsenzym *Eco* 105I verdaut und der „Sonde2“ hybridisiert. Da innerhalb der Transformationskassette keine *Eco* 105I Restriktionsschnittstelle vorhanden war, sollte das Hybridisierungssignal bei einer Integration des Transgens ca. 1,6 kB (*Hph*-Gen und Regelelemente) größer sein als beim

Wildtyp. Neben einem Signal der WT-Kontrolle von ca. 17 kB bei allen Linien war bei den Linien 5, 17, 23, 25, 26 und 101 ein weiteres Signal von ca. 7,6 kB zu detektieren. Das aus der Größe der WT-Kontrolle resultierende Signal von 18,6 kB bei mitochondrialen Transformanten war nicht vorhanden. Ein weiteres Signal der WT-Kontrolle von 6 kB (7,6 kB abzüglich 1,6 kB des *hph*-Gens und der Regelelemente) konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Eine Integration der Transformationskassette in das *orf87/nad3/rps12*-Gen-Cluster ist daher unwahrscheinlich. Möglicherweise ist die Transformationskassette an einen andern Ort innerhalb des mitochondrialen Genoms integriert. Bei einer Kernintegration des Transgens wäre eine einheitliche Signalgröße von 7,6 kB nicht zu erwarten.

Die mit dem Restriktionsenzym *Xba* I verdaute DNA der Linien PGM 2, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 15, 16 und 17 wurde mit der Sonde „*hph*“ hybridisiert. Die erwartete Signalgröße bei einer mitochondrialen Integration von 4,2 kB war bei den Linien 2, 6, 7, 8, 10, 11, 15, 16 und 17 vorhanden. Eine gezielte Integration der Transformationskassette in das mitochondriale Genom wäre möglich. Da das Restriktionsenzym *Xba* I innerhalb der homologen mitochondrialen flankierenden Sequenzen im 5'- und 3'-Bereich des *hph*-Gens im Transformationsvektor schneidet, ist bei einer Integration dieser Kassette in ein anderes genetische Kompartiment ein Hybridisierungssignal in gleicher Größe zu erwarten. Ein eindeutiger mitochondrialer Nachweis war somit nicht möglich. Weitere Hybridisierungssignale mit unterschiedlichen Bandengrößen dürften auf eine unspezifische Integration der Transformationskassette in das Kerngenom zurückzuführen sein.

Sowohl die „long-PCR“- als auch die Southern-Analysen lassen eine gezielte mitochondriale Integration der Transformationskassette vermuten. Bei allen Southern-Analysen waren jedoch uneinheitliche Hybridisierungsmuster vorhanden. Der Nachweis einer eindeutigen gezielten mitochondrialen Integration der Transformationskassette war somit nicht möglich. Nicht erwartete einheitliche Signalgrößen bei einigen Linien deuten auf eine Integration in ein anderes mitochondriales Umfeld. Bei den meisten Untersuchten Linien wurde die Transformationskassette offenbar mehrfach integriert. Dabei könnte es sich um Kernintegrationen der Transformationskassette handeln, da die Hybridisierungssignale eine unterschiedliche Größe besaßen.

Neben der schwierigen Analyse der potentiellen Transformanten könnte ein weiterer Nachteil die Größe des Transformationsvektors pBM*hph* II von 10,3 kB gewesen sein. Versuche bei Plastidentransformationen in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass mit zunehmender Größe des Transformationsvektors die Transformationseffizienz geringer wird. Zwar dürfte die Länge der homologen Flanken als positiv für eine homologe Rekombination zu bewerten sein,

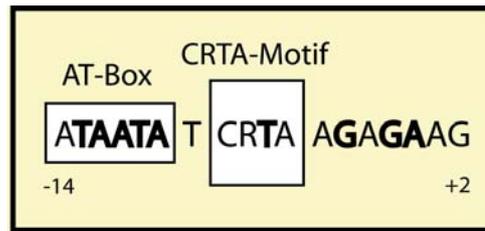
aufgrund der Vektorgröße könnte es jedoch zu methodischen Problemen kommen (z.B. geringere Stabilität des Vektors während des „particle gun“-Beschusses oder geringere Effizienz des Vektors bei der Integration in das Mitochondriengenom). Mit den Transformationsvektoren pBM*hph* III und pBM*hph* IV, bei denen die flankierenden mitochondrialen Sequenzen verkleinert waren, wurden eine große Anzahl an potentiellen mitochondrialen Transformanten selektiert. Mit PCR-Analysen konnte keine mitochondriale Insertion nachgewiesen werden (Kapitel 3.1.2.1). Interessanterweise konnte bei 95 selektierten Transformanten das *hph*-Gen mittels PCR nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung könnte die Integration der Transformationskassette in das Kerngenom sein. Eine zufällige Integration des *hph*-Gens im 3'-Bereich eines starken Kernpromotors könnte eine zur Selektion ausreichende Resistenz gegenüber Hygromycin vermitteln. Bei eigenen Transformationsexperimenten, in denen versucht wurde das *hph*-Gen in das Plastidengenom zu integrieren und als Marker zu nutzen, waren die Resultate ähnlich. Es konnte kein plastidärer Nachweis erbracht werden, obwohl die meisten selektierten Klone ebenfalls positiv auf eine Integration des *hph*-Gens getestet worden sind. Es ist jedoch auch möglich, dass die Transformationskassette an einer anderen Stelle ins mitochondriale Genom integriert worden ist. Die ausgewählte intergenische („spacer“-) Region, die 2,3 kB hinter dem *orf87/nad3/rps12*-Cluster lokalisiert ist, enthält nach heutigem Stand keine Regelemente und ist transkriptions-inaktiv. Durch die hohe Rekombinationsaktivität der mitochondrialen Genome ist es nicht unwahrscheinlich, dass diese Region in mehreren Kopien in unterschiedlichen Fragmentgrößen auf dem Mitochondriengenom bei Tabak vorhanden ist. Die Analyse einer möglichen Integration der Transformationskassette in einem anderen genetischen Umfeld wäre ohne genaue Kenntnisse der mitochondrialen Sequenzdaten nicht möglich. Durch stetige Rekombinationsereignisse zwischen „short repeats“ und „long repeats“ wäre es denkbar, dass die Transformationskassette zwar korrekt an der richtigen Stelle integriert wurde, aber im Laufe weiterer Rekombinationen teilweise wieder verlorengegangen ist. Da die mitochondriale Genomorganisation bei Tabak bisher nicht ausreichend charakterisiert ist, könnten neben dem „mastercircle“ zahlreiche „subcircles“ in unterschiedlichen stoichiometrischen Verhältnissen vorhanden sein. Bei zwei *cms*-Typen des Tabaks werden beispielsweise unterschiedliche Deletionen in „subcircles“, die durch Rekombinationsereignisse entstanden sind, als mögliche Ursache für die cytoplasmatische männliche Sterilität diskutiert (Chetrit et al., 1992). Zur Entgiftung des Antibiotikum könnte es ausreichen, wenn eine Kopie des *hph*-Gens auf einem „subcircle“ vorhanden ist. In Southern-, Northern- und Westernanalysen wäre eine quantitative Unterscheidung zwischen

einer mitochondrialen Integration und einer Integration ins Kerngenom ohne vorherige Zellfraktionierung nicht möglich.

Dass es zu Rekombinationsereignissen im Bereich des gewählten Integrationsortes kommen kann, beweist das Vorhandensein der zwei Gencluster. In diesem Fall reichte zur homologen Rekombination ein 22 Bp großes Fragment, welches sowohl zwischen *nad3/nad1* als auch zwischen *nad3/rps12* vorhanden ist. Eine Integration der Transformationskassette zwischen dem *orf87* und dem *nad3*-Gen wäre eine mögliche Alternative (Abb.4.1). Ob in dieser ca. 610 Bp großen Region regulatorische Elemente vorhanden sind, die bei einer Integration des Resistenzgens gestört werden, ist nicht bekannt. Es könnte aber in diesem Fall zu ‚normalen‘ Rekombinationsereignissen zwischen den beiden Genclustern kommen. Als Folge würde das inserierte Gen wieder eliminiert werden.

#### 4.1.4.2.2 Mitochondriale Regelemente

Die mitochondrialen Gene höherer Pflanzen sind in der Regel über das ganze Genom verteilt und von vielen zum Teil sehr großen, nicht kodierenden Bereichen umgeben. Im Unterschied zu den vielen kodierenden Bereichen sind die nichtkodierenden 5'- und 3'-Bereiche der Gene schwach konserviert (Gray et al., 1992). Eine Besonderheit bei mitochondrialen Genen ist die bereits beschriebene Clusterbildung durch häufige Rekombinationsereignisse. Die Transkriptionsinizierung, -prozessierung und -terminierung mitochondrialer Gene oder Gencluster können dabei sehr komplex sein. Durch die Identifizierung mitochondrialer Promotoren in monocotylen und dicotylen Pflanzen konnten dabei erste gemeinsame Sequenzbereiche charakterisiert werden (Shadel und Clayton, 1993; Binder et al., 1993a, 1995; Tracy und Stern, 1995). Bei „*in vitro*“-Transkriptionsexperimenten konnte eine 18 Bp große Consensus-Sequenz identifiziert werden, die bei dicotylen Pflanzen unabhängig vom genetischen Umfeld die gesamte Promotorfunktion erfüllen kann (Dombrowski et al., 1999). In dieser Consensus-Sequenz konnte mit Hilfe von Deletionsstudien bei Erbse, Sojabohne und *Oenothera* ein AT-reiches Element (AT-Box) charakterisiert werden, welches bei Fehlen zu einem kompletten Verlust der Promotoraktivität führt. In Abb. 4.2 ist die 18 Bp große Consensus-Sequenzen von Promotoren unterschiedlicher mitochondrialer Gene dargestellt.



**Abb. 4.2 Mitochondriale Promotorelemente.** Fettgedruckte Buchstaben in der AT-Box bedeuten ein über 90%ige Homologie der Basen A/T bei dicotylen Pflanzen. Fettgedruckte Buchstaben außerhalb der AT-Box bedeuten eine 100%ige Homologie der jeweiligen Basen.

Neben der für dicotyle Pflanzen essentiellen AT-Box ist mit dem CRTA-Element ein weiteres Promotorelement vorhanden. Dieses CRTA-Element ist bei dicotylen und monocotylen Pflanzen das einzige gemeinsame bisher bekannte Promotorelement (Fey und Maréchal-Drouard, 1999).

Der in dieser Arbeit verwendete *atpA*-Promotor von *Oenothera berteriana* (Binder und Brennicke, 1993) enthält die 18 Bp große Consensus-Sequenz und wurde in heterologen „*in vitro*“-Transkriptionssystemen erfolgreich getestet. Als Terminatorregion wurde ein *atp9*-Genfragment von *Pisum sativum* (Morikami und Nakamura, 1987) verwendet. Bei einer mitochondrialen Integration der Transformationskassette sollte das jeweilige Resistenzgen erfolgreich transkribiert werden.

#### 4.1.4.2.3 Resistenzgene

Das in der Transformationskassette pBM<sub>bsr</sub> I eingesetzte Resistenzgen *bsr* stammt aus einer resistenten Linie von *Bacillus cerus* (Endo et al., 1988). Es wurde erstmals 1990 als pflanzlicher Selektionsmarker bei Tabak getestet (Kamakura et al., 1990). Die Autoren beschreiben eine Kotransformation mit *ntpII* (Neomycin Phosphotransferase) als weiterem Resistenzgen. Bei einer Koselektion mit Kanamycin und Blasticidin konnten positive Klone selektiert werden, die eine hohe Resistenz gegenüber Blasticidin aufwiesen. Es ist jedoch fraglich, ob es ohne Kotransformation möglich ist, Transformanten zu erhalten. In dieser Arbeit konnten mit Blasticidin keine geeigneten Selektionsbedingungen erreicht werden, die eine erfolgreiche Selektion von Transformanten erlaubt hätten (siehe Kapitel 3.1.1). In der Literatur gibt es keine weiteren Veröffentlichungen, die Transformationen von höheren Pflanzen mit dem *bsr*-Gen beschreiben.

Mit dem Resistenzgen *ntpII*, das bei sensitiven Pflanzen das am häufigsten verwendete Markergen zur Transformation des Zellkerns ist, konnten 1993 Tabakplastiden erfolgreich transformiert werden (Carrer et al., 1993). Leider konnte dieses Markersystem aufgrund der schlechten Selektionseffizienz im Vergleich zur Spectinomycin- und Streptomycinselektion mit dem *aadA*-Gen nicht weiter genutzt werden. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet,

das *nptII*-Gen für eine potentielle Mitochondrientransformation zu nutzen. Inzwischen erscheint es durchaus sinnvoll eine mitochondriale Selektion mit Kanamycin zu versuchen, da es Huang et al. (2002) gelungen ist, ein effizientes Selektionssystem mit Kanamycin bei Tabakplastiden durch Transformation mit dem *aphA-6*-Gen aus *Acinetobacter baumannii* zu etablieren (siehe Kapitel 4.2.3).

Das *hph*-Gen aus *E.coli*, das für die Hygromycin B Phosphotransferase kodiert, wurde 1983 erstmals bei *Saccharomyces cerevisiae* als Markergen eingesetzt (Gritz und Davies, 1983; Rao et al., 1983). Seit 1991 wird es auch bei höheren Pflanzen als Markergen für Kerntransformationen eingesetzt (Bilang et al. 1991). Ein Vorteil des *hph*-Gens gegenüber anderen Markergenen ist, dass alle Pflanzen eine natürliche Sensitivität gegenüber Hygromycin besitzen. Dies machte Hygromycin zu einer Alternative gegenüber Kanamycin, welches bei einigen Pflanzenarten aufgrund von vorhandenen Resistenzen (z.B. Mais) nicht genutzt werden kann. Hygromycin hemmt die Proteinsynthese in Pro- und Eukaryonten und ist damit auch als potentieller Marker zur Mitochondrientransformation geeignet. Ob die auf Hygromycin selektierten Klone auf eine zufällige Integration der Transformationskassette ins Kerngenom oder auf eine mitochondriale Integration zurückzuführen sind, konnte, wie bereits diskutiert nicht eindeutig geklärt werden. Interessant ist jedoch, dass das *hph*-Gen sowohl bei Versuchen zur Mitochondrientransformation als auch bei Versuchen zur Plastidentransformation nachgewiesen werden konnte. In beiden Fällen war eine organellspezifische Integration des *hph*-Gens nicht erfolgreich. Möglicherweise wird das *hph*-Gen in das Kerngenom integriert und durch kernspezifische Regelelemente exprimiert. Für weitere Plastiden- oder Mitochondrientransformationen wäre es daher sinnvoll, die Transformationskassetten so zu verändern, dass bei einer Integration des *hph*-Gens in das Kerngenom das Ablesen des Gens durch kernspezifische Regelelemente verhindert wird.

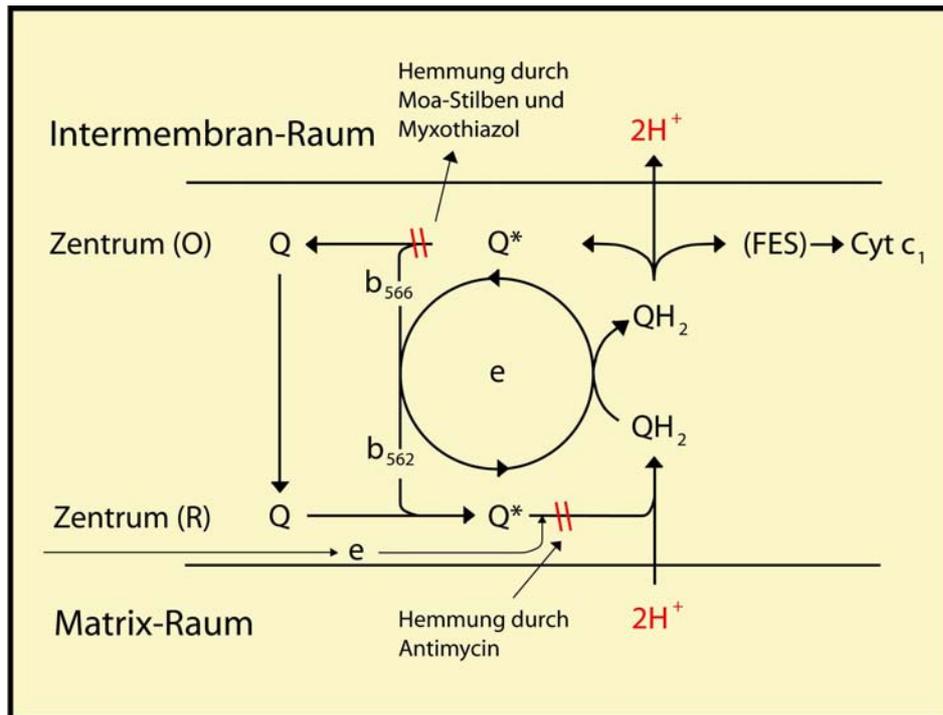
Das in der Transformationskassette pBMcat I eingesetzte *cat*-Gen aus *E.coli* (Alton und Vapnek, 1979) hemmt die Elongation an den 50S- und 70S Ribosomen und ist damit als potentieller mitochondrialer Marker verwendbar. Zur Detoxifizierung wird das Chloramphenicol an zwei Positionen acetyliert und dadurch in drei Produkte gespalten. Bei chloramphenicol- und streptomycinresistenten Spontanmutanten des Pilzes *Phytophthora infestans* wird eine mitochondriale Vererbung diskutiert. Bei Hybridisierungsexperimenten konnte zwar eindeutig eine cytoplasmatische Vererbung der Streptomycinresistenz nachgewiesen werden, eine eindeutige cytoplasmatische Vererbung der Chloramphenicolresistenz war aber nicht möglich (Whittacker et al., 1996). Als Alternative zu dem Reportergen *GUS* ( $\beta$ -Glucuronidase) wurde das *cat*-Gen in der Vergangenheit häufig

bei Pflanzenassays verwendet. Eine Selektion von Pflanzentransformanten mit Chloramphenicol als alleinigem Selektionsmarker ist in der Literatur nicht beschrieben worden. In Tests zu den Selektionsbedingungen konnte zwar die sensitive Wirkung von Chloramphenicol auf verschiedene Gewebearten bei Tabak nachgewiesen werden, eine erfolgreiche Selektion von Transformanten war jedoch nicht möglich (siehe Kapitel 3.1.1). Eine mögliche Ursache könnte zu geringer Selektionsdruck auf das Mitochondriengenom sein. Chloramphenicol penetriert laut Gräfe (1992) nicht durch die Mitochondrienmembran. Eine ausreichende Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese wäre demnach nicht gegeben.

#### 4.1.4.3 Mitochondrienspezifische Transformationsvektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten mitochondrienspezifischen Transformationsvektoren pUM*myxII*, pUM*gluII*, pUM*argII* und pUM*antiII* sind, wie bereits in Kapitel 2.4.7 beschrieben, alle nach dem gleichen Grundprinzipien kloniert worden (Abb.2.1). Die in das *cob*-Fragment eingeführten Punktmutationen sollen zu einer Veränderung in der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des Apocytochroms *b* führen. Die Inhibitoren wären damit nicht mehr in der Lage, an den Komplex zu binden. Die Antibiotika Antimycin A, Myxothiazol und Moa-Stilben inhibieren die Übertragung der Elektronen auf Cytochrom *c*.

Sie hemmen als allosterische Inhibitoren den Elektronentransport von Cytochrom *b* zu Cytochrom *c*<sub>1</sub> im Komplex III der mitochondrialen Atmungskette. Der Wirkort der Inhibitoren betrifft unterschiedliche Domänen des Cytochrom-*b*-Komplexes. Ähnlich dem Cytochrom-*b*<sub>6/f</sub>-Komplex in der Thykaloidmembran von Plastiden existiert auch im Komplex III (Ubichinon-Cytochrom-*c*-Reduktase) der Mitochondrien ein zyklischer Elektronentransport. In diesem als Q-Zyklus bezeichneten Prozess werden zwei Moleküle QH (Semichinon) in QH<sub>2</sub> (Dihydrochinon) und Q (Ubichinon) umgewandelt und ein Elektron auf Cytochrom *c* übertragen. Für QH<sub>2</sub> existieren dabei zwei Bindestellen. Die eine liegt an der Matrix-Seite Q<sub>R</sub> (Reduktion von QH zu QH<sub>2</sub>), die andere an der Cytosol-Seite Q<sub>O</sub> (Oxidation von QH zu Q). In Abb.4.3 ist dieser Zyklus schematisch dargestellt. Die verwendeten Inhibitoren Myxothiazol und Moa-Stilben verhindern dabei die Oxidation von QH zu Q mit der Folge, dass dem Q-Zyklus kein „rotierendes“ Elektron zur Verfügung steht (Di Rago et al., 1989; Tokito und Daldal, 1993; Kraiczky et al., 1996; Affourit et al., 2000). Antimycin hemmt hingegen die Reduktion von QH zu QH<sub>2</sub> an der Matrix-Seite des Komplexes III (di Rago und Colson 1988; Tron und Lemesle-Meunier 1990).



**Abb. 4.3** Zyklischer Elektronentransport im Komplex III der Mitochondrien.

Bei der Betrachtung eines 8-stufigen transmembranen Cytochrom-*b*-Modells von Brasseur, 1988 wird deutlich, dass die durch Punktmutationen im *cob*-Fragment veränderten Aminosäuren zu strukturellen Veränderungen im Intermembranraum (Myxothiazol und Moa-Stilben können nicht mehr binden) und Matrixraum (Antimycin kann nicht mehr binden) von Cytochrom *b* führen. Solche strukturellen Veränderungen, verbunden mit Resistenzen gegenüber mitochondrialen Inhibitoren der Atmungskette, sind für viele unterschiedliche Spezies unter anderem *Saccharomyces*, *Chlamydomonas*, Fischmitochondrien (z.B. Esposito et al., 1990) und Mausmitochondrien (Howell und Gilbert, 1988), beschrieben worden.

Bei höheren Pflanzen sind bisher noch keine mitochondrialen Mutanten charakterisiert worden, die entsprechende Mutationen besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass „natürliche“ Resistenzen z.B. gegen Diuron oder Stigmatellin bei höheren Pflanzen konserviert sind. Das *cob*-Gen von Tabak ist sensitiv gegenüber den verwendeten Inhibitoren Antimycin A, Myxothiazol und Moa-Stilben. Die Sequenz des *cob*-Gens von Tabak (U92011 NCBI-Datenbank) zeigt an den Aminosäurepositionen 41 (Glycin), 135 (Phenylalanin) und 143 (Glycin) keine zur Resistenz führenden Mutationen. Durch Einführen eines mutierten *cob*-Fragments mit den Transformationskassetten pUMmyxII, pUMgluII, pUMargII und pUMantiII in das Mitochondriengenom sollte es durch die eingeführten Punktmutationen zu einer strukturellen Veränderung von Cytochrom-*b* kommen und damit zu Resistenzen gegenüber Antimycin A, Myxothiazol oder Moa-Stilben. Tatsächlich konnten nur potentielle

Transformanten identifiziert werden, die mit dem Konstrukt pUMargII und pUMmyx II transformiert wurden. Die positiv getesteten Linien wurden ausschließlich mit der Transformationskassette pUMarg II mit Moa-Stilben als Hemmstoff selektiert. Eine bei diesem Konstrukt theoretisch mögliche Selektion mit Myxothiazol war nicht erfolgreich. Als potentielles Zielgewebe bei dem mitochondrienspezifischen Ansatz war es weder mit Suspensionskulturen noch mit Protoplasten möglich, positive Transformanten zu identifizieren.

Positive Transformanten konnten ausschließlich aus grünen Tabakblättern erhalten werden. Es konnten zwei Linien selektiert werden, die aus *rpo*-Blattstücken hervorgegangen sind. Bei ihnen konnte das mutierte *cob*-Fragment jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine molekularbiologische Charakterisierung von 18 selektierten PGMarg-Transformanten (Kapitel 3.1.2.2) konnte eine eindeutige mitochondriale Integration nicht bestätigen. In allen Linien konnte das eingeführte mutierte *cob*-Fragment nachgewiesen werden, eine Integration in das native mitochondriale *cob*-Gen konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Dieses Ergebnis wirft folgende Fragen auf: In welches genetische Umfeld (Mitochondrien, Plastiden, Kern) wurde das *cob*-Fragment integriert? Warum war es mit Moa-Stilben möglich, Transformanten zu selektieren, obwohl das *cob*-Fragment nicht ins native *cob*-Gen eingebaut worden ist? Wieso konnten mit den Antibiotika Antimycin A und Myxothiazol keine potentiellen Transformanten selektiert werden?

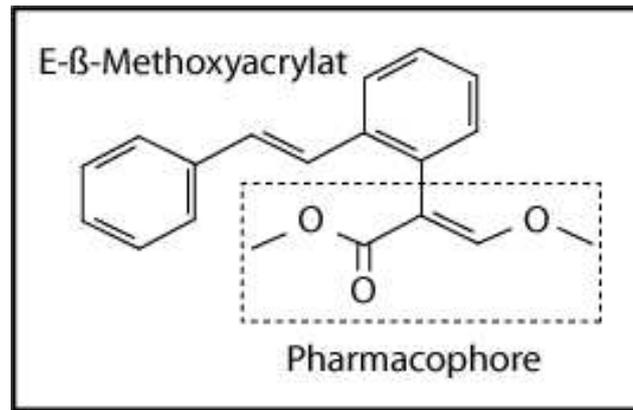
Die Transformationskassetten pUMmyxII, pUMgluII und pUMantiII (Selektion mit Antimycin bzw. Myxothiazol) unterscheiden sich konzeptionell nicht von der Transformationskassette pUMargII. Alle ausgewählten Punktmutationen sind durch Literaturangaben belegt und führen bei verschiedenen Spezies zu Resistenzen gegenüber den verwendeten Antibiotika (Kapitel 1.4.1). Nachträgliche Basenveränderungen durch RNA-editing treten im *cob*-Gen von Tabak an insgesamt 19 Nukleotiden auf. Es handelt sich dabei ausschließlich um Substitutionsediting (Ortega et al., 2000). Alle zur Punktmutation ausgewählten Nukleotide unterliegen keinem nachträglichen „editing“.

Eine Selektion mit Antimycin und Myxothiazol ist im Gegensatz zu Moa-Stilben nicht bei Blattstücken möglich (siehe Kapitel 3.1.1.1 und 4.1.5). Bei Protoplasten und Suspensionskulturen ist eine Selektion nur in einem schmalen „Selektionsfenster“ möglich. Dies bedeutet, dass, je nach Entwicklungsstadium der Regenerate, die Antibiotikumkonzentration exakt angepasst werden muss. Eine zu hohe Konzentration führt zum Absterben der Transformanten, eine zu geringe Konzentration führt zur Regeneration von „falsch positiven“ Zellen. Demgegenüber besitzt Moa-Stilben ein breites Selektionsfenster. Ob dies

die Gründe für fehlende Transformanten unter Antimycin- bzw. Myxothiazolselektion sind, bleibt fraglich. Möglicherweise besitzen Antimycin und Myxothiazol weitere entscheidende wachstumshemmende Eigenschaften auf Pflanzenzellen, welche eine Selektion von Mitochondrientransformanten nicht erlauben.

Auch bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Chlamydomonas reinhardtii* ist es trotz Identifizierung zahlreicher Atmungskettenmutanten bis jetzt nicht gelungen, Antimycin oder Myxothiazol als Selektionsmarker einzusetzen (Giessler et al., 1994; Bonnefoy und Fox, 2001, 2002). Bei Mutanten mit unterschiedlichen Punktmutationen im *cob*-Gen konnten zwar anhand von Versuchen mit isolierten Mitochondrien Resistenzen gegenüber verschiedenen mitochondrialen Inhibitoren nachgewiesen werden, eine Nutzung dieser mitochondrialen Inhibitoren als Selektionsmarker ist bisher jedoch nicht beschrieben worden (siehe Kapitel 1.4.1). Es stehen aber bei *Saccharomyces cerevisiae* und bei *Chlamydomonas reinhardtii* zahlreiche *oxi*- bzw. *dum*-Mutanten zur Verfügung, die eine Selektion mit mitochondrialen Inhibitoren überflüssig machen (Colin et al., 1995; Boynton und Gillham, 1996; Butow et al., 1996; Duby und Matagne, 1999). Möglicherweise ist es analog zu Pflanzenzellen nicht möglich, mit Antimycin oder Myxothiazol mitochondriale *Saccharomyces*- oder *Chlamydomonas*-Klone zu selektieren.

Moa-Stilben bzw. E- $\beta$ -Methoxyacrylat bzw. Enol Ether Stilbene ist ein künstliches Antibiotikum und wurde 1984 von ICL erstmals synthetisiert. Grundlage dieser Synthese waren die aus Basidiomyceten isolierten Antibiotika Strobilurin A (Mucidin) und Oudemansin A. Der einfache Aufbau, die starke fungizide Wirkung gegenüber anderen Pilzarten und dabei eine relative Unempfindlichkeit tierischer und pflanzlicher Zellen gegenüber diesem Antibiotikum machten sie zu einem idealen Ausgangsprodukt für synthetische Fungizide (Weber et al., 1990). Es zeigte sich, dass bei den aus drei Teilen bestehendem E- $\beta$ -Methoxyacrylat die Pharmacophore ( $\beta$ -Methoxyacrylat) für die fungizide Wirkung verantwortlich sind (siehe Abb.4.4) (Sauter et al., 1995).



**Abb. 4.4 Struktur des mitochondrialen Hemmstoffes E-β-Methoxyacrylat.**

Aus E-β-Methoxyacrylat wurden von ICL, Zeneca, BASF und anderen Pharmakonzernen zahlreiche spezifische Fungizide für den Pflanzenschutz entwickelt (Sauter et al., 1999). Obwohl E-β-Methoxyacrylat den gleichen Wirkort (Cytosol-Seite  $Q_0$  im Komplex III der Atmungskette) besitzt wie Myxothiazol, sind aufgrund seiner Struktur trotz hoher Konzentrationen, die bei der Selektion von pflanzlichen Transformanten nötig sind, keine Eigenschaften festzustellen, die zusätzlich den Stoffwechsel der Pflanzenzelle belasten. Die Photostabilität und damit die Lebenszeit des Wirkstoffes ist gegenüber den „natürlichen“ Antibiotika Myxothiazol und Antimycin deutlich größer (Sauter et al., 1999). Außerdem scheint die Penetration von E-β-Methoxyacrylat durch die Mitochondrienmembran von pflanzlichen Zellen wesentlich besser zu sein. Eine Selektion von Blattstücken wäre sonst ähnlich wie bei Antimycin und Myxothiazol nicht möglich (siehe Kapitel 4.15). Eine Selektion von positiven Transformanten mit E-β-Methoxyacrylat scheint diese Vermutung zu bestätigen.

Unklar ist der Integrationsort des *cob*-Fragments. Damit eine erfolgreiche Selektion mit Moa-Stilben gewährleistet ist, muss das *cob*-Fragment funktionell integriert worden sein. Eine funktionelle Integration ist aus heutiger Sicht nur innerhalb des mitochondrialen *cob*-Gens oder des plastidären Cytochrom  $b_6$ -Gens möglich. Im Kerngenom dürfte eine Integration des *cob*-Fragments funktionslos sein. Selbst bei im Laufe der Evolution importierten *cob*-Genkopien in das Kerngenom (bei Tabak sind bisher noch keine *cob*-Genkopien im Kerngenom beschrieben worden; in Vorversuchen konnte bei Southern-Analysen von Gesamt-DNA nur ein *cob*-Signal detektiert werden) ist es sehr unwahrscheinlich, dass ein transformiertes *cob*-Fragment durch homologe Rekombination eingebaut worden ist. Eine funktionelle Auslagerung des *cob*-Gens vom Mitochondriengenom ins Kerngenom ist im Gegensatz zu anderen Genen des Atmungskettenkomplexes (z.B. *cox II*-Gen) nicht beschrieben worden (siehe Kapitel 1.2). Das heißt: Selbst bei einer erfolgreichen Integration

durch homologe Rekombination des *cob*-Fragments in das Kerngenom wären keinerlei Funktion und damit keinerlei Resistenzeigenschaft gegeben. Eine Integration des *cob*-Fragments durch homologe Rekombination in das Cytochrom *b<sub>6</sub>*-Gen der Plastiden ist nicht auszuschließen. Der Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex ist jedoch bei vielen Plastiden insensitive gegenüber Antimycin A, Myxothiazol und Moa-Stilben (Esposti et al., 1993; Ortega et al., 2000). Eine Integration des mutierten *cob*-Fragments ins insensitive Plastidengenom von Tabak dürfte somit keine Auswirkungen auf Resistenzeigenschaften besitzen. Bei dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 ist der plastidäre Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex insensitive gegenüber Myxothiazol, und sensitiv gegenüber Stigmatellin und DBMIB (2,5-Dibrom-3-Methyl-6-Isopropyl-p-Benzoquinon). Durch homologe Integration einer Transformationskassette, die Basenaustausche an den Positionen 148, 154 und 159 des *petB*-Gens besitzt, ist es gelungen, eine erhöhte Resistenz gegenüber DBMIB und Stigmatellin und eine erhöhte Sensitivität gegenüber Myxothiazol zu erreichen (Lee et al., 2001). Mit mitochondrialen Transformationskassetten wäre es bei entsprechenden Punktmutationen theoretisch durchaus möglich gewesen, funktionsfähige Plastidentransformanten zu erhalten. Es wurden in der Literatur bisher keine Plastidentransformationen beschrieben, die auf Punktmutationen innerhalb des Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex zurückzuführen sind. Die bei *Synechococcus* sp. PCC 7002 erreichte Resistenz gegenüber DBMIB und Stigmatellin konnte nicht zur Selektion genutzt werden (Lee et al., 2001).

Eine funktionelle Integration des *cob*-Fragments wäre demnach nur ins Mitochondriengenom möglich. Obwohl in Vorversuchen nur eine *cob*-Bande in Southern-Experimenten detektiert werden konnte, ist es dennoch möglich, dass weitere *cob*-Gene bzw. *cob*-Pseudogene im Mitochondriengenom von Tabak vorhanden sind. Eine mitochondriale Sequenz, die sowohl das *cob*-Gen als auch das Restriktionsfragment enthält, könnte in einem oder mehreren ‚subcircles‘ integriert worden sein. Bei einigen Spezies (*Brassica napus*, Arabidopsis, Kartoffel, Erbse) liegt das *cob*-Gen in einem Gencluster und wird zusammen mit *rpl15-rps14* transkribiert (Hoffmann et al., 1999; Brandt et al., 1993; Ye et al., 1993; Aubert et al., 1992). Bei *Oenothera* ist das *cob*-Gen in einem anderen genetischen Umfeld lokalisiert (Schuster, 1993). In den mitochondrialen Genomen von Reis und Weizen sind jeweils zwei Kopien des *cob*-Gens vorhanden (Saalaoui et al., 1990; Kaleikau et al., 1992). In beiden Fällen wird trotz gleichen Promotor-Motivs das Pseudogen nicht oder nur in geringem Umfang transkribiert. Im Unterschied zu den Pseudogenen besitzen die *cob-1*-Gene im 3'-Bereich eine RNA-„double-stem-loop-structure“. Die Autoren diskutieren neben einer gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression des *cob*-Pseudogens eine Beteiligung der RNA-

Sekundärstruktur an der Transkriptionsinizierung der *cob*-1-Gene. Bei Tabak ist bisher nicht bekannt, ob und wie viele *cob*-Pseudogene im mitochondrialen Genom vorhanden sind und ob das *cob*-Gen in einem Gencluster lokalisiert ist. Eine Integration der Transformationskassette pUMarg II in möglicherweise vorhandene *cob*-Pseudogencluster kann ausgeschlossen werden, da in diesem Fall sowohl der 5'-Bereich als auch der 3'-Bereich identisch zum originalen Gencluster wären. PCR-Analysen zum Nachweis einer mitochondrialen Integration würden identische Ergebnisse liefern. Das Fehlen eines positiven PCR-Signals bei gleichzeitiger Integration der Transformationskassette pUMargII in das Mitochondriengenom wäre nur zu erklären, wenn das *cob*-Fragment in ein oder mehrere Pseudogene eingebaut worden ist. Bei *Vicia faba*, *Brassica napus* und Erbse sind im 5'- und 3'-Bereich des *cob*-Gens „double inverted repeats“ vorhanden (Hoffmann et al., 1999; Wahleithner und Wolstenholme, 1988). Solche „inverted repeats“ können das Vorhandensein von Pseudogenen wie z.B. bei Reis und Weizen erklären. Ob die Transformationskassette in ein oder mehrere solcher Pseudogene integriert worden ist, müssen weitere Analysen zeigen. Die eingesetzten Transformationskassetten pUMmyx II, pUMglu II, pUMarg II und pUManti II enthalten nur einen Teil des Tabak-*cob*-Gens (siehe Kapitel 2.4.7). Die ursprüngliche Absicht, das komplette *cob*-Gen von Tabak zusammen mit entsprechenden Regelementen und homologen mitochondrialen Flanken zusätzlich zum nativen *cob*-Gen zu integrieren, wurde verworfen. Es ist bei Tabak auf Grund von fehlenden mitochondrialen Sequenzdaten zur Zeit noch schwierig, geeignete „stille Orte“ für eine homologe Integration eines Transgens zu finden. Zusätzlich würde immer die Gefahr bestehen, dass es aufgrund der hohen Homologie zwischen dem mutierten und nativen *cob*-Gen zu unerwünschten Rekombinationsereignissen kommen könnte. Selbst bei heterologen *cob*-Genen wäre die Gefahr einer ungewünschten homologen Rekombinationen aufgrund der sehr starken Konservierung des *cob*-Gens immer gegeben.

Bei mono- und dicotylen Pflanzen sind Promotorelemente für unterschiedliche mitochondriale Gene und Gencluster charakterisiert worden (Kapitel 4.1.4 ). Ob sie jedoch zur Transkription des *cob*-Gens ausreichen, ist nicht geklärt. Für eine Expression des *cob*-Gens sind neben den mitochondrialen Promotorsequenzen zahlreiche kernkodierte Faktoren verantwortlich (z.B. Cbp2, Mrs1, Nam2, Cbs1, Cb2; Weeks und Cech, 1996; Bousquet et al., 1990; Li et al., 1994; Michaelis et al., 1991). Ein Fehlen dieser kernkodierten Faktoren führt bei *Saccharomyces cerevisiae* beispielsweise zu einem veränderten Phänotyp (Chen und Dieckmann, 1997). Essentiell für die Expression des *cob*-Gens ist das kernkodierte Protein Cbp1, das für die *cob*-mRNA-Stabilität verantwortlich ist (Chen et al., 1999). Cbp1 interagiert

mit einem CCG-Element in einer 64 Bp langen Sequenz im 5'-Bereich des *cob*-Gens. Ein Fehlen der 64 Bp langen Sequenz oder eine Mutation im CCG-Element führen zu einem Abbau der *cob*-mRNA durch mitochondriale Nukleasen. Ob solche oder ähnliche kernkodierte Faktoren auch bei höheren Pflanzen zu finden sind, ist noch unklar. Falls sie bei Tabak oder Arabidopsis vorhanden sind, reichen AT-Box und CRTA-Element als alleinige Promotorelemente für das *cob*-Gen nicht aus.

#### 4.1.5 Bestimmung der Selektionsbedingungen

Die bei der Markergen-Strategie ausgewählten Resistenzgene *bsr*, *cat* und *hph* verleihen Resistenzen gegenüber den Antibiotika Blastidicin, Chloramphenicol und Hygromycin. Zur Ermittlung von optimalen Selektionbedingungen zur Selektion von Mitochondrien-transformanten bei Tabak wurden mit Blattstücken und Protoplasten bzw. Mikrokolonien Testreihen mit verschiedenen Antibiotikumkonzentrationen durchgeführt.

Bei den Testreihen mit Blastidicin konnten sowohl bei Blattstücken als auch bei Protoplasten/Mikrokolonien keine zur Selektion von Transformanten geeigneten Antibiotikumkonzentrationen ermittelt werden (Kapitel 3.1.1). Ab einer Konzentration von 2-3mg/l Blastidicin im Regenerationsmedium sterben die Blattstücke. Bei geringeren Blastidicin-Konzentrationen erfolgt eine starke Kallus- und Sprossbildung insbesondere an den Blatträndern. Bei Testreihen mit Protoplasten liegt die kritische Blastidicin-Konzentration die zu einem Absterben der Mikrokolonien führt, zwischen 2,5 und 3 mg/l. Werden niedrigere Blastidicin-Konzentration gewählt, ist bei allen Konzentrationen ab der 3. Woche ein Durchwachsen der Kolonien zu beobachten. Offenbar ist das Selektionsfenster bei einer Selektion mit Blastidicin sehr schmal. Um eine erfolgreiche Selektion zu gewährleisten, sollte jedoch ein gewisser Selektionsspielraum vorhanden sein. Bei einer zu stringenten Selektion mit Blastidicin besteht die Gefahr, dass alle potentiellen Transformanten absterben. Bei einer zu hohen Blastidicin-Konzentration sind die Pflanzenzellen nicht mehr in der Lage, sich zu teilen. Eine Replikation des Transgens wäre damit ausgeschlossen. Bei weniger stringenten Selektionsbedingungen würde es zur Regeneration von „falsch positiven“ Zellen kommen. Eine Identifizierung von mitochondrialen Transformanten wäre unter solchen Bedingungen schwierig.

Die von Kamakura et al. (1990) beschriebene kernkodierte Blastidicinresistenz bei Tabak konnte ebenfalls nicht zur Selektion genutzt werden. Die transformierten und auf Kanamycin selektierten Pflanzen zeigten beim Besprühen der Blätter mit 50mg/l Blastidicin keine Schädigungen, während die Blätter der Kontrollpflanzen zahlreiche Chlorosen aufwiesen. Eine Sprossregeneration aus Blattstücken transformierter Pflanzen war mit 2,5 mg/l

Blasticidin im Regenerationsmedium möglich. Eine Nutzung von Blasticidin als alleiniger Selektionsmarker war nicht möglich und ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Testreihen mit Chloramphenicol zeigten im Gegensatz zum Blasticidin ein „breites“ Selektionsfenster. Bei Blattstücken ist in Abhängigkeit zur Antibiotikumkonzentration ein deutlicher Unterschied der Regenerationfähigkeit festzustellen (Kapitel 3.1.1). Trotz dieser sensitiven Wirkung von Chloramphenicol auf Blattstücke war keiner der ursprünglich 76 auf 45 mg/l Chloramphenicol selektierten Klone positiv. Ein Grund könnte die schlechte Penetration von Chloramphenicol in die Zellen sein. Bei Sprossen war trotz Erhöhung der Chloramphenicolkonzentration auf über 60 mg/l keine hemmende Wirkung mehr festzustellen. Der Transport von Chloramphenicol scheint demnach im pflanzlichen Gewebe gering zu sein. Geeignete Bedingungen für eine Selektion von Protoplasten mit dem Antibiotikum Chloramphenicol konnten nicht ermittelt werden.

Mit dem Antibiotikum Hygromycin konnten in Gegensatz zu den anderen Antibiotika der Markergen-Strategie zahlreiche Klone selektiert werden. Im Laufe der Testreihen und der Transformationsexperimente wurde deutlich, dass eine stufenweise Erhöhung der Hygromycin-Konzentration die besten Erfolge liefert. Ähnlich wie bei Blasticidin existiert zwar zu Selektionsbeginn ein „schmales Selektionsfenster“ bei allen Gewebearten, durch die stufenweise Erhöhung der Hygromycin-Konzentration konnte aber ein „Durchwachsen“ von „falsch positiven“ Zellen bis auf wenige Ausnahmen verhindert werden. Die meisten positiven Klone (89) konnten nach Transformationen von grünen Blattstücken bei einer Anfangskonzentration von 35 mg/l identifiziert werden. Die Hygromycin-Konzentration wurde bis auf maximal 55 mg/l während der Regenerationsphase erhöht. Eine geringere Anzahl (6) an positiven Klonen wurde bei der Selektion von Protoplasten bzw. den daraus resultierenden Mikrokolonien erzielt. PEG-Transformationen mit Protoplasten wurden jedoch nur mit der Transformationskassette *pBM<sub>hph</sub> II* durchgeführt. Aufgrund der guten Penetration von Hygromycin während der ersten Zellstadien wurde die Anfangskonzentration auf 20mg/l gesenkt und dann stufenweise auf 30 mg/l erhöht.

## 4.2 Plastidentransformation

Bei dem plastidären Transformationsansatz werden in dieser Arbeit zwei Ziele verfolgt. Zum einen wird der Gehalt der essentiellen Aminosäure Lysin gesteigert und zum anderen wird ein neues antibiotikumfreies plastidäres Selektionssystem etabliert. Als sogenanntes „Markergen“ wurde das mutierte *dhdps-r1*-Gen aus dem Kerngenom von Tabak zum eingesetzt (siehe auch Kapitel 1.4.2). Durch plastidäre Transformation mit diesem Gen wird der Mechanismus der Endprodukthemmung bei der DHDPS inhibiert. Die Regulation der Lysinproduktion im

Aspartat-Stoffwechsel wird damit beeinträchtigt. Als Folge ergibt sich eine gesteigerte Lysinproduktion und damit verbunden eine gleichzeitige Selektionsmöglichkeit mit dem Lysinanaloga AEC. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es durch einen plastidären Transformationsansatz möglich ist, die biotechnologische Produktion der essentiellen Aminosäure Lysin mit der Etablierung eines neuen universellen Selektionssystems zu kombinieren.

#### **4.2.1 Aufbau der Transformationsvektoren**

Zur Konstruktion der plastidären Transformationskassetten wurden zwei Strategien verfolgt: Zum einen wurden die Gene *dhdps-r1* und *aadA* als künstliches polycistronisches Operon unter die Kontrolle eines 16S-Promotors gestellt (pHoDh2b). Zum anderen wurde die entgegengesetzte Orientierung gewählt, wobei die Gene jeweils unter Kontrolle eines 16S-Promotors standen (pHoDh1a). Beide Strategien konnten bei anderen Plastidentransformationen erfolgreich angewendet werden. Leider war es nur mit der Transformationskassette pHoDh2b möglich, Transformanten zu erhalten. PCR-Analysen mit unterschiedlichen Primerkombinationen belegen zwar die korrekte Integration aller Komponenten in den Transformationsvektor pHoDh1a, es war jedoch trotz verschiedener Sequenzierungsansätze nicht möglich, den Bereich der beiden 16S-Promotoren darzustellen. Offenbar haben sich in diesem Bereich Strukturen ausgebildet, die sich nur schwer sequenzieren lassen. Problematisch könnte auch die Wahl von zwei 16S-Promotoren in einer Transformationskassette sein. Durch bereits beschriebene Rekombinationsereignisse (siehe Kapitel 4.1.4.1) zwischen den Promotorelementen könnte es nach einer erfolgten Transformation zu einer Eliminierung der Transformationskassette aus dem Plastidengenom gekommen sein. Bei ähnlich aufgebauten plastidären Transformationskassetten mit zwei gleichen Promotoren konnten jedoch Transformanten erhalten werden (pers. Mitteilung Z. Zhouong). Bei der weiteren Konzeption von Transformationskassetten sollten unterschiedliche Promotorelemente berücksichtigt werden. Alle auf Spectinomycin oder AEC selektierten plastidären Transformanten gehen aus Transformationen mit der Transformationskassette pHoDh2b hervor.

#### **4.2.2 Veränderung des Lysingehaltes durch Plastidentransformation**

Die Erhöhung des Lysingehaltes in höheren Pflanzen ist seit Anfang der 90er Jahre verstärkt in das Interesse der Forschung gerückt. Die essentielle Aminosäure Lysin ist dabei der am meisten limitierende Faktor in der auf Getreide basierenden Tierernährung. In der Schweine- und Geflügelmast müssen z.B. lysinhaltige Futtermittelzusatzstoffe dem Tierfutter

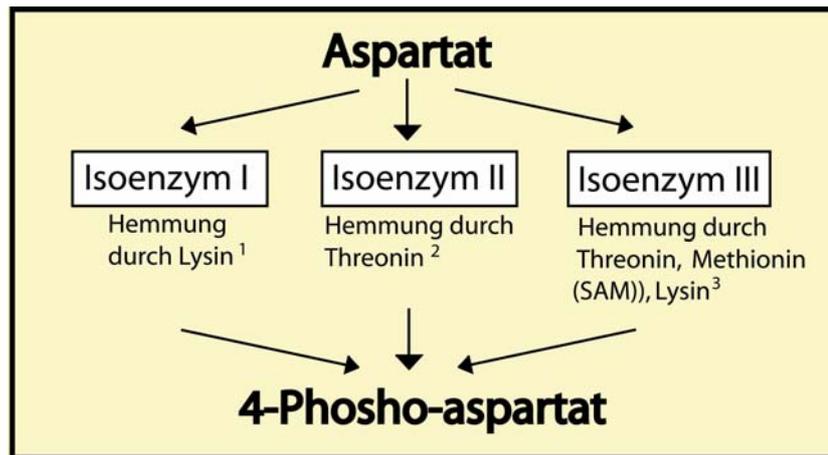
hinzugefügt werden. Dieses Lysin stammt hauptsächlich aus der fermentativen Lysinproduktion mit dem Bakterium *Corynebacterium glutamicum*. Durch eine Erhöhung des Lysingehaltes der verwendeten Futterpflanzen könnte eine kostengünstige Möglichkeit zur Vermeidung von Lysinmangel genutzt werden. Die Lysinbiosynthese ist Bestandteil des Aspartat-Stoffwechsels. Innerhalb des Aspartat-Stoffwechsels katalysiert die Dihydrodipicolinat-Synthase (DHDPS) den ersten Schritt der Lysinbiosynthese, der Kondensation von 3-Aspartat-semialdehyd mit Aspartat zu 2,3-dihydrodipicolinat (siehe Abb. 1.4). Weitere enzymatische Reaktionen folgen, bis das Endprodukt Lysin erreicht ist. Zur Steuerung der Stoffwechselprozesse gibt es mehrere regulatorische Mechanismen. Unter anderem hemmt Lysin bereits in geringen Konzentrationen die DHDPS. Diese Endprodukthemmung bewirkt eine exakte Steuerung der Lysinproduktion. Die Biosynthesewege der Aminosäuren Threonin, Methionin und Isoleucin innerhalb des Aspartat-Stoffwechsels werden durch diese Endprodukthemmung nur indirekt beeinflusst (s. u.). Durch die Charakterisierung der DHDPS bei Tabak (Gishlain et al., 1990), und der Identifizierung und Charakterisierung der lysininsensitiven Mutante RAEC-1 (Shaul und Galili, 1992b, Gishlain et al., 1995) wurde es möglich den „feed back“-Mechanismus gezielt zu beeinträchtigen. Das *dhdps-r1*-Gen der RAEC-1-Mutante konnte bei Tabak und Kartoffel erfolgreich ins Kerngenom integriert werden. In ausdifferenzierten Tabakblättern wurden bis zu 1380 nmolLysin/g Frischgewicht erreicht. Im Vergleich zum Wildtyp bedeutet dies eine 15-fache Steigerung an freiem Lysin (Jacobs et al., 1999.). Bei der DHDPS handelt es sich, wie bei den meisten am pflanzlichen Aspartat-Stoffwechsel beteiligten Enzymen, um ein kernkodiertes plastidäres Protein (Bryan, 1980; Jacobs et al., 1999). Bei einer direkten Integration des mutierten *dhdps-r1*-Gens ins Plastidengenom sollte es aufgrund des sehr hohen Ploidiegrades der Plastiden zu einer deutlich stärkeren Akkumulation von Lysin im Pflanzengewebe kommen. Diese Annahme wurde experimentell bestätigt. Es wurden in dieser Arbeit plastidäre Tabaktransformanten selektiert, die bis zu 6325 nmolLysin/g Frischgewicht aufwiesen. Dies bedeutet eine bis zu 32-fache Steigerung an freiem Lysin im Blattgewebe. Die höchste bisher erreichte Steigerung des Lysingehaltes bei Tabak konnte nach einer Kerntransformationen mit dem bakteriellen *dapA*-Gen aus *E.coli* erreicht werden. Es wurde eine bis zu 40-fache Erhöhung an freiem Lysin im Blattgewebe von Tabak nachgewiesen (Perl et al., 1992). Der bakterielle Aspartatstoffwechsel ist in seiner Funktion dem pflanzlichen Aspartatstoffwechsel sehr ähnlich. Ein wichtiger Unterschied ist die geringe Sensitivität (20-200-fach geringere Sensitivität im Vergleich zur pflanzlichen DHDPS) gegenüber Lysin (Glassmann, 1992; Falco et al., 1995; Galili, 1995; Vauterin et al., 2000).

Die Gründe für die im Vergleich hohe Sensitivität der pflanzlichen DHDPS sind unter anderem in der kristallinen und quaternären Struktur der pflanzlichen DHDPS begründet (Blickling und Knäblein, 1997; Blickling et al., 1997). Die Regulation der bakteriellen Lysinsynthese ist durch die Sensitivität der Diaminopimelat-decarboxylase gewährleistet. Sie katalysiert den letzten enzymatischen Schritt im Lysin-Stoffwechsel, ist sensitiv gegenüber Lysin und wird von dem Gen *lysA* kodiert. Im pflanzlichen Stoffwechsel ist die Diaminopimelat-decarboxylase nicht vorhanden (Vauterin et al., 2000). Um den „feed back“-Mechanismus bei Pflanzen zu umgehen, wurde das bakterielle *dapA*-Gen bei zahlreichen Kerntransformationen verwendet. Bei Kartoffel konnte trotz einer 50fachen Steigerung der DHDPS-Aktivität in Blättern „nur“ eine 5fache Erhöhung des freien Lysingehaltes gemessen werden. Eine 50-fache Steigerung der DHDPS-Aktivität in Blättern von Tabak führte dagegen zu einer 40-fachen Erhöhung des Lysingehaltes (Perl et al., 1993). Offenbar ist die Feinregulierung der Lysinakkumulation innerhalb des Aspartatstoffwechsels zwischen den Pflanzenarten unterschiedlich.

Die Aspartatkinase ist das erste Enzym des Aspartatstoffwechsels und liegt bei Pflanzen in zwei, teilweise auch drei Isoenzymen vor. Diese Isoenzyme werden sowohl durch Threonin als auch Lysin durch „feed back“-Inhibition reguliert (Abb 4.5).

---

**Abb. 4.5 Isoenzyme der Aspartatkinase bei Pflanzen.** <sup>1</sup> Ein Isoenzym wird unabhängig von der Gesamtanzahl der Isoenzyme nur von Lysin gehemmt. <sup>2</sup> Sind zwei Isoenzyme vorhanden, wird dieses von Threonin und S-Adenosyl-methionin (SAM) gehemmt. <sup>3</sup> Ist ein drittes Isoenzym vorhanden, kann eine Hemmung durch Lysin, Threonin und (SAM) erfolgen.



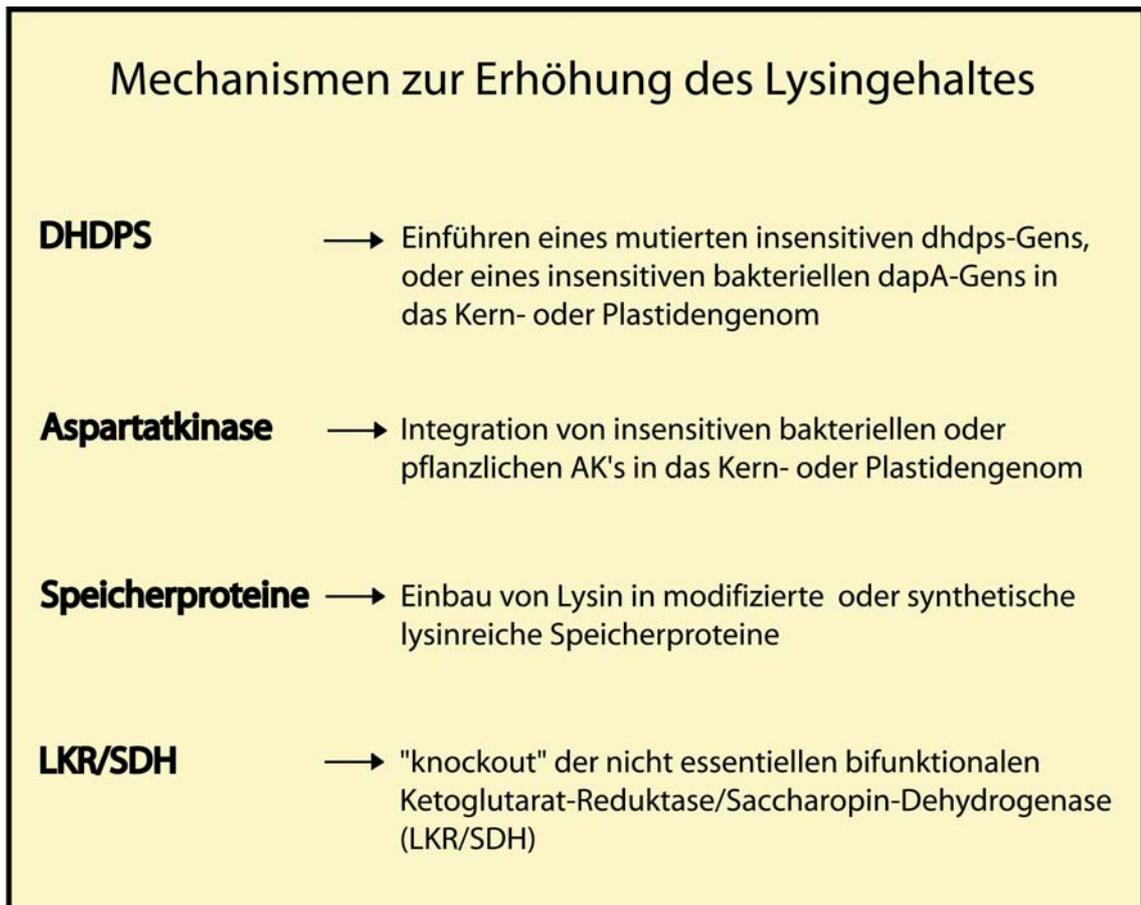
Bei Gerste konnten drei Isoenzyme charakterisiert werden. Zwei sind sensitiv gegenüber Lysin und das dritte Isoenzym ist sensitiv gegenüber Threonin (Rognes et al., 1983, Galili, 1995). Bei Möhre sind zwei Isoenzyme identifiziert worden. Ein Isoenzym ist sensitiv gegenüber Threonin, das andere ist sensitiv gegenüber Lysin. Die Lysinkonzentrationen, die zu einer Hemmung der Isoenzyme der Aspartatkinase führen, liegen im mM-Bereich, während die DHDPS schon im  $\mu\text{M}$ -Bereich (ab  $10 \mu\text{M}$ ) gehemmt wird (Vauterin et al., 2000). Ob bei Tabak und Kartoffel zwei oder drei Isoenzyme der Aspartatkinase vorhanden sind, ist noch unklar. Aufgrund der verschiedenen Lysingehalte bei DHDPS-insensitiven Kerntransformanten von Tabak und Kartoffel wird eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Aspartatkinase gegenüber Lysin diskutiert (Perl et al., 1993; Galili, 1995). Möglicherweise sind auch gewebe- oder entwicklungspezifische Unterschiede bei Tabak und Kartoffel dafür verantwortlich. Bei Erbse, Möhre, Sojabohnen und Arabidopsis sind gewebe- oder entwicklungspezifische Unterschiede der Aspartatkinase-Aktivität beschrieben worden (z.B. Matthews und Widholm, 1979; Lea et al., 1979; Vauterin et al., 1999).

In dieser Arbeit wurden sechs Plastomtransformanten zur biochemischen Analyse ausgewählt. Der Gehalt an freiem Lysin variiert bei den Linien B1, B2, B3, B4, B5 und C21 zwischen 226 und 6325 nmol Lysin/g Frischgewicht (bis zu 32-fach gegenüber dem Wildtyp erhöht). Leider konnte die DHDPS-Aktivität der einzelnen Linien nicht bestimmt werden, da nicht genügend Pflanzenmaterial zur Verfügung stand. In einem Probeversuch konnte bei der Linie B5 im Vergleich zum Wildtyp ein Vielfaches an DHDPS-Aktivität nachgewiesen werden. Bei einer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Diplomarbeit (L. Schaeffer) konnten plastidäre Tomatentransformanten (*Lycopersicon esculentum* cv. MoneyMaker) selektiert werden, die mit der Transformationskassette pHoDh2b transformiert wurden. Es konnte bei Kallusgewebe eine bis zu 200%-ige und bei Blattgewebe eine 20%-ige Erhöhung an freiem Lysin im Vergleich zum Blattgewebe des Wildtyps gemessen werden. Die DHDPS-Aktivität im

Kallusgewebe war bei einer Linie um mehr als das zweifache im Vergleich zum Blattgewebe des Wildtyps erhöht. Die Ergebnisse der Plastidentransformation von Tabak und Tomate bestätigen damit die Annahme einer unterschiedlichen Sensitivität der Aspartatkinase und eines gewebespezifischen Unterschied bei höheren Pflanzen. Aufgrund der hohen Variabilität des Lysingehaltes und der DHDPS-Aktivität muss es unabhängig von der Aspartatkinase noch weitere Faktoren geben, die an der Regulierung der Lysinproduktion beteiligt sind. Perl et al. (1993), beschreiben eine unterschiedliche Akkumulation von Lysin in Abhängigkeit von der Gewebeart. Nach einer Kerntransformation mit dem bakteriellen *dapA*-Gen konnten in der Kartoffelknolle die höchsten Werte an freiem Lysin gemessen werden. Der Gehalt in den Blättern konnte zwar gesteigert werden, er lag aber 1,5-fach unter den Lysinwerten der Knolle. Die DHDPS-Aktivität war demgegenüber bei fast allen Kartoffelklonen im Wurzelgewebe am höchsten. Weitere biochemische Untersuchungen der plastidären Tabakklone (Wurzel, Fruchtkörper, Samen) konnten aufgrund des geringen Gewebematerials noch nicht durchgeführt werden. Von großer Bedeutung scheint nicht nur die Gewebeart, sondern auch das Alter des Gewebes zu sein. Frankard et al. (1992), untersuchten bei einer RAEC-1-Tabak-Mutante den Aminosäurepool während der gesamten Wachstumsperiode. In den ersten zehn Wachstumswochen stieg der Lysingehalt von 1,9% (Anteil am Gesamtaminosäurepool) stetig auf 5%. Zwischen der 10. und 12. Woche gab es einen exponentiellen Anstieg auf über 30%. Bis zum Ende der Vegetationsperiode in der 18. Woche sank der Lysingehalt wieder auf 5%. Der prozentuale Lysingehalt im Tabak-Wildtyp lag während der gesamten Wachstumsperiode zwischen 1,9 und 2,3%. Die Lysinmessung der plastidären Tabaktransformanten erfolgte ca. 8-10 Wochen nach der ersten Zyklisierung auf AEC oder Spectinomycin. Eine Bestimmung des gesamten Aminosäurepools wurde nicht durchgeführt. Legt man den Aminosäurepool eines Tabak-Wildtyps zu Grunde, würde der Lysinanteil am Gesamtaminosäurepool bei den Plastomtransformanten bis zu 45% betragen. Bei einer homoplastomischen Integration des *dhdps-r1*-Gens würde man aufgrund des hohen Ploidiegrades einen noch höheren Gehalt an Lysin erwarten. Um homoplastomische Transformanten zu erhalten, ist es notwendig, mehrere Zyklisierungsschritte durchzuführen. In der Regel sind 2-5 Zyklisierungen auf selektivem Medium nötig. Es konnten sowohl mit AEC als auch Spectinomycin als Hemmstoff keine homoplastomischen Linien zyklisiert werden. Bei weiteren Zyklisierungsschritten sind alle Linien abgestorben. Es könnte sein, dass das tolerierbare Maximum an freiem Lysin mit ca. 45% innerhalb des Aminosäurepools erreicht ist. Diese Annahme spiegelt sich auch in dem Phänotyp der auf Spectinomycin selektierten Linien B1, B2, B3, B4 und B5 wider. Alle Klone zeigen einen verkümmerten

langsamen Wuchs, die Blätter sind lanzettartig verkleinert, blassgrün mit weißen Bereichen. Eine Apikaldominanz fehlt vollständig (siehe Abb. 3.17). Fertile Pflanzen konnten nicht beobachtet werden. Dieser abnorme Phänotyp ist auch bei Kerntransformanten beobachtet worden, die einen sehr hohen Gehalt an freiem Lysin aufwiesen (Frankard et al., 1992; Jacobs et al., 1999). Es ist davon auszugehen, dass nur solche plastidären Linien zyklisiert werden konnten, die „nur“ eine bis zu 32-fache Erhöhung an freiem Lysin aufgewiesen haben. Bei einer Vielzahl von selektierten positiven Linien war die Anzahl der transplastomischen Kopien bereits im Ursprungszyklus so hoch, dass eine möglicherweise toxische Lysinmenge überschritten worden ist und die Linien abgestorben sind.

Aspartat als Ausgangssubstrat des Lysinstoffwechsels wird durch eine erhöhte Lysinproduktion nicht negativ beeinflusst. Bei einer RAEC-1-Tabak-Mutante, bei der die Lysinmenge um das 21-fache gesteigert war, lag der Gehalt an Aspartat um 66% höher als beim Wildtyp. Beim Vergleich der freien Aminosäuren dieser Mutante konnten überraschenderweise keine großen Differenzen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Einzig der Gehalt an freiem Threonin sank um 45%, was sich bei Betrachtung des gesamten Pools (freies und gebundenes Threonin) wieder relativiert (Frankard et al., 1992; Jacobs et al., 1999). Eine starke Absenkung des Threoningehaltes ließe sich allein mit einer hohen Lysinkonzentration nicht erklären. Es ist keine Endprodukthemmung der Threoninsynthese durch Lysin bekannt (siehe Abb. 1.4) und Aspartat als Ausgangssubstrat liegt in der Mutante in größerer Menge vor als im Wildtyp. Offenbar wird Threonin verstärkt in threoninhaltige Polypeptide integriert oder unterliegt ab bestimmten Konzentrationen einem stärkeren enzymatischen Abbau. Interessant wäre ein Vergleich des Aminosäurepools der plastidären Transformanten mit den Kerntransformanten gewesen. Leider konnte der Gehalt an freien und gebundenen Aminosäuren in den plastidären Transformanten nicht untersucht werden. Bei Tomaten-Linien, die mit der gleichen Transformationskassette (pHoDh2b) wie die Tabak-Linien transformiert wurden (Diplomarbeit L. Schaeffer), konnten neben der Aminosäure Lysin auch der Gehalt der Aminosäure Threonin und Aspartat bestimmt werden. Der Gehalt an freiem Threonin im Blattgewebe war bei einer Linie um das 4,5-fache, der Gehalt an freiem Aspartat um das 4,8-fache im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Potentiell ist eine weitere Steigerung des Lysingehaltes durch Plastidentransformation möglich. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, regulatorisch sowohl in den Lysinabolismus als auch den Lysinkatabolismus einzugreifen (Abb. 4.6).



**Abb. 4.6 Mechanismen zur Erhöhung des Lysingehaltes bei Pflanzen.**

Eine weitere Erhöhung der Aminosäuren des Aspartatstoffwechsels könnte durch Transformationen mit insensitiven Aspartatkinasen erreicht werden. Bei *E.coli* gibt es drei Isoenzyme der Aspartatkinase (AK I, AKII, und AK III), die jeweils sensitiv gegenüber Threonin, Methionin und Lysin sind. Für alle drei Isoenzyme konnten insensitive Mutanten charakterisiert werden (Kikuchi et al., 1999). Bei Alfalfa (*Medicago sativa L.*), einer lysinreichen Futterpflanze konnte die Threonin-insensitive AK II aus *E.coli* erfolgreich ins Kerngenom integriert werden. Der Threoningehalt konnte in Blättern von Alfalfa auf das bis zu 2,5-fache gesteigert werden (Galili et al., 2000). Eine höhere Steigerung des Threoningehaltes wäre nicht zu erwarten gewesen, da die Homoserindehydrogenase, ein Enzym innerhalb der Threoninsynthese, sensitiv gegenüber Threonin ist (siehe Abb. 1.4). Eine Integration der Lysin-insensitiven AK III von *E.coli* in das Kern- oder Plastidengenom wäre ebenfalls denkbar. Sie weist in vielen Bereichen große Homologien zur Aspartatkinase von Arabidopsis auf (Tang et al., 1997).

Lysinreiche Kern- und Plastidentransformanten sind aufgrund des hohen Gehaltes an freiem Lysin nicht in der Lage, sich normal zu entwickeln. Um den Gehalt an freiem Lysin zu reduzieren, wäre es einerseits möglich, auf der Ebene des Lysinkatabolismus regulatorisch

eingzugreifen, andererseits könnte ein Einbau von Lysin in lysinreiche Speicherproteine sinnvoll sein. Mit den genetisch modifizierten Proteinen „hordothionine 12“ (HT12) und „barley high-lysine protein 8“ (BHL8) konnte der Gesamtlysingehalt bei gleichzeitiger Kernintegration des bakteriellen *dapA*-Gens in Maiskörnern um das 3,5-fache im Vergleich zum Wildtyp gesteigert werden (Jung und Carl, 2000). In Tabaksamen konnte mit Hilfe von heterologen samenspezifischen Promotoren ein lysin- und methioninreiches synthetisches Protein (CP 3-5) exprimiert werden (Keeler et al., 1997). Eine Steigerung des Lysingehaltes in Tabaksamen durch Transformation mit dem bakteriellen *dapA*-Gen oder dem mutierten *dhdps-r1*-Gen konnte ohne weitere regulatorische Eingriffe in den Lysinstoffwechsel nicht erreicht werden (Perl et al., 1992; Frankard et al., 1992; Jacobs et al., 1999).

Eine erhöhte Lysinkonzentration in der Pflanzenzelle bewirkt einen Anstieg von Metaboliten innerhalb des Lysinkatabolismus, welche ein wichtiger regulatorischer Bestandteil unter anderem bei der Stressabwehr sind. Lysin wird bei Pflanzen in mehreren enzymatischen Schritten in Glutamat, Pipecolinsäure und Acetyl-Co-A katabolisiert (Abb. 4.7).

Als Hauptprodukt des Lysinkatabolismus ist Glutamat eine Vorstufe von drei bedeutenden stressregulierenden Metaboliten: Prolin, ein stark wirksames Osmotikum,  $\gamma$ -Aminobuttersäure, ein stressregulierendes Signalmolekül und Arginin, eine potentielle Vorstufe von weiteren stressregulierenden Metaboliten. Glutamat selbst ist ein wichtiges Signalmolekül bei der Steuerung von tierischen und menschlichen Nervenzellen (Platenik et al., 2000) und soll bei Pflanzen ein wichtiger Rezeptor bei der Abwehr von Schadorganismen sein (Lam et al., 1998; Brenner et al., 2000). Eine zusätzliche Erhöhung des Gehaltes an freiem Lysin durch Transformation mit dem *dapA*- oder *dhdps-r1*-Gen führt zu einer weiteren Erhöhung dieser Metaboliten (Galili und Hoefgen, 2001; Galili et al., 2001). Zhu et al. (2001) konnten bei Arabidopsis durch eine T-DNA-Insertion in Exon 13 des Gens der bifunktionalen Ketoglutarat Reduktase/Saccharopin Dehydrogenase (LKR/SDH) „knockout“-Mutanten selektieren, bei denen die ersten beiden Schritte im Lysinkatabolismus unterbrochen sind (siehe Abb. 4.7).

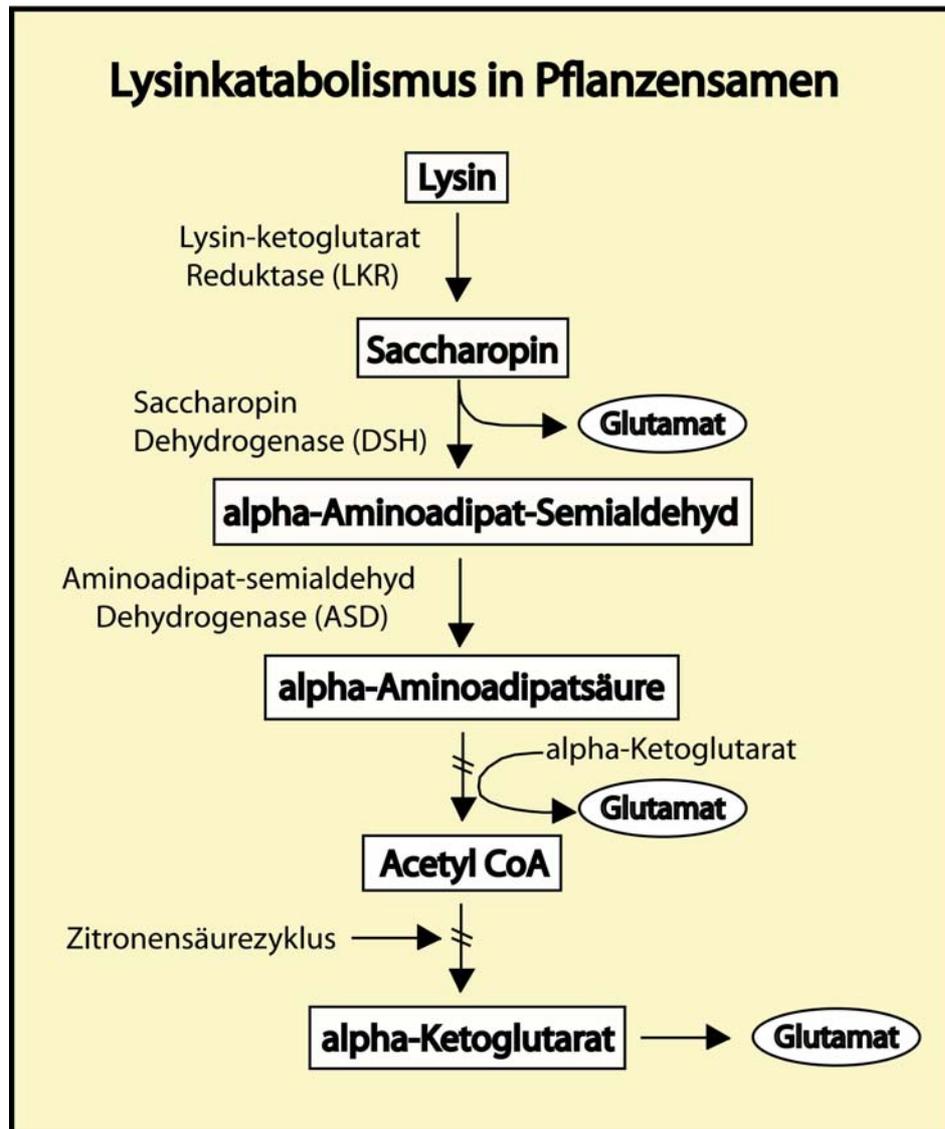


Abb. 4.7 Lysinkatabolismus bei Pflanzen

Unter normalen Wachstumsbedingungen unterscheidet sich der Phänotyp der Mutante nicht vom Wildtyp. Der Lysinkatabolismus bei Pflanzen ist somit nicht essentiell. Der Lysingehalt in den Samen dieser Arabidopsis-Mutante war um das 3-fache gegenüber dem Wildtyp erhöht. Bei Transformation dieser „knockout“-Mutante mit einem insensitiven bakteriellen *dapA*-Gen konnte der Gehalt an freiem Lysin in den Samen um das 80-fache im Vergleich zum Wildtyp gesteigert werden. Gleichzeitig ist eine 38-fache Erhöhung von Methionin, eine Erhöhung von Glutamin und Asparagin sowie eine Absenkung von Aspartat und Glutamat zu beobachten (Zhu et al., 2002; Zhu und Galili, 2003).

Die verschiedenen regulatorischen Mechanismen (insensitive DHDPS, insensitive Aspartatkinase, synthetische Speicherproteine, „knockout“ der LKR/SDH) zur Steuerung des Lysingehaltes könnte sinnvoll kombiniert zur biotechnologischen Produktion in Pflanzen genutzt werden (siehe auch Abb. 4.6). Um eine normale Pflanzenentwicklung zu

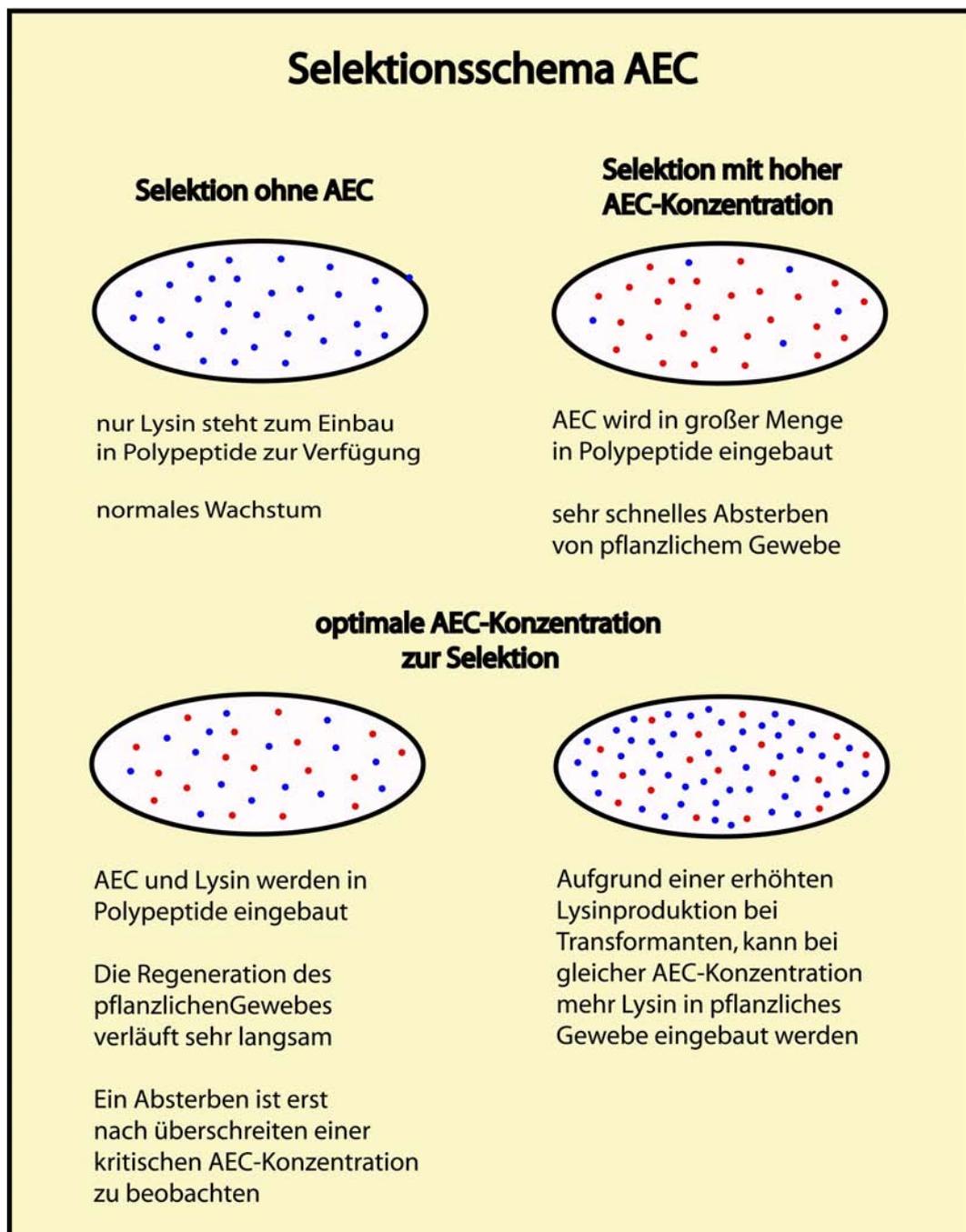
gewährleisten, sollte eine Überexpression von Lysin und lysinreichen Proteinen durch spezifische Promotoren auf pflanzliche Speicherorgane wie z.B. Samen, Wurzeln, Knollen oder Fruchtkörper begrenzt werden.

#### **4.2.3 AEC, ein universeller antibiotikafreier plastidärer Selektionsmarker**

Die routinemäßige Transformation von Tabakplastiden ist seit Einsatz des selektierbaren Markers *aadA* möglich (Svab und Maliga, 1993, Golds et al., 1993). Die Effektivität dieses Selektionssystems liegt dabei zwischen 0,5 und 5 Transformanten pro „particle-gun“-Beschuss (Svab und Maliga, 1993, Sugita et al. 1997, Daniell et al. 1998, Khan und Maliga, 1999). Durch Veränderung der Lichtbedingungen während der Selektion (low-light-selection) konnten 2001 erstmals Tomatenplastiden erfolgreich mit dem *aadA*-Gen transformiert werden (Ruf et al.). Die Selektionseffizienz war aber im Vergleich zu Transformationen von Tabakplastiden mit dem selektierbaren Markers *aadA* um das bis zu 10-fache geringer (Ruf et al., 2001). Mit dem *aphA-6*-Gen aus *Acinetobacter baumannii* ist es Huang et al., (2002) bei Tabakplastiden gelungen, ein zweites effizientes Selektionssystem mit Kanamycin als Selektionsmarker zu etablieren. Das *aphA-6*-Gen aus *Acinetobacter baumannii* verfügt über ein breiteres Spektrum der Aminoglycosid-Detoxifizierungsaktivität als das von Carrer et al. (1993) benutzte *nptII*-Gen (Wright und Thompson, 1999). Dadurch wurde es möglich, Selektionseffizienzen zu erreichen, die bis zu 50mal höher sind als bei der Verwendung des *nptII*-Gens (Huang et al., 2002). Der erste antibiotikumfreie Selektionsmechanismus bei Plastidentransformationen wurde mit Betain-Aldehyd als Hemmstoff beschrieben (Daniell et al., 2001; Beschreibung siehe Kapitel 1.4.2). Das *badh*-Gen ist jedoch bei vielen Pflanzenspezies vorhanden und somit nicht als Markergen nutzbar. Die Akzeptanz für einen routinemäßigen Einsatz dieses Selektionssystems dürfte daher gering sein, zumal die Kosten des Betain-Aldehyds sehr hoch sind. Weitere effektive plastidäre Selektionssysteme sind bei Pflanzen zur Zeit noch nicht verfügbar. Plastidentransformationen mit anderen Pflanzenarten (Reis, Arabidopsis und *Lesquerella fendleri*) sind zwar möglich, aber wenig effizient (Sikdar et al., 1998, Khan und Maliga, 1999, Skarjinskaia et al., 2003). Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz einer Selektion mit dem Lysinanaloga AEC hat gegenüber allen bisher beschriebenen plastidären Transformationssystemen zahlreiche Vorteile:

- **potentielle Selektion mit AEC bei allen Pflanzenarten**
- **antibiotikumfreier Marker**
- **biotechnologische Nutzung der essentiellen Aminosäure Lysin**

Durch die Integration eines insensitiven Gens für das Enzym DHDPS in das Kerngenom von Pflanzen ist es möglich mit dem Lysinanaloga AEC Klone zu selektieren (Negrutiu et al., 1984; Perl et al., 1993; Ñopo et al., 2001). AEC konkurriert als Lysinanaloga mit Lysin um den Einbau in Polypeptide. Wird die AEC-Konzentration im Verhältnis zu Lysin zu hoch, kommt es zum Erliegen des Stoffwechsels und damit zum Absterben der Zelle. Durch die Überproduktion von Lysin in den Transformanten verschiebt sich das Verhältnis. Es kann somit mehr Lysin in die Polypeptide eingebaut werden. Dies lässt sich als Selektionsvorteil nutzen (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8 Selektionsschema AEC.** Blaue Punkte symbolisieren Lysinmoleküle, rote Punkte AEC-Moleküle.

In dieser Arbeit wurde ein insensitives *dhdps*-Gen erstmals in das plastidäre Genom von Tabak inseriert. Bei Transformationen wurden die Blattstücke bzw. Mikrokolonien mit Spectinomycin oder AEC selektiert. Alle selektierten Transformanten wurden mit der biolistischen Methode transformiert. Mit AEC als Hemmstoff konnten 52 Linien selektiert werden. Aus acht Linien konnten Pflanzen regeneriert werden. Die Selektionsbedingungen wurden während der Regenerationsphase mehrfach variiert. Die in den Selektionstest mit Tabak-Wildtyp ermittelten Konzentrationen von 45-55  $\mu\text{M}$  AEC für Blattstücke und 60-80  $\mu\text{M}$  AEC für Sprosse erwiesen sich als zu hoch. In den ersten drei Wochen nach der Transformation wurde mit einer Konzentration von 55  $\mu\text{M}$  AEC selektiert. Danach erfolgte eine stufenweise Absenkung der AEC-Konzentration auf 45, 40 und 35  $\mu\text{M}$ . Erst dadurch wurde es möglich, Pflanzen zu regenerieren. Negrutiu et al. (1984) selektierten Tabak-protoplasten der RACE-1-Mutanten in ähnlichen Konzentrationsbereichen (40-50  $\mu\text{M}$  AEC). Trotz dieser stufenweisen Absenkung der AEC-Konzentration sind zahlreiche Sprossen abgestorben. Versuche, die AEC-Konzentration bereits am Anfang der Selektion abzusenken, waren nicht erfolgreich, da das Selektionsfenster zu Beginn der Selektion sehr schmal ist und zu „falsch positiven“ Zellen führte. Das Wachstum der plastidären Linien war im Vergleich zu den mit Spectinomycin selektierten Linien sehr stark eingeschränkt, der Phänotyp ansonsten normal, d.h. die Appikaldominanz war nicht beeinträchtigt und Blattdeformationen konnten nicht beobachtet werden. Ein Wurzelwachstum war bei den verwendeten AEC-Konzentrationen nicht vorhanden. Erst bei einer weiteren Absenkung der AEC-Konzentration konnte vereinzelt Wurzelwachstum beobachtet werden. AEC im Selektionsmedium hemmt offenbar ab bestimmten Konzentrationen die Wurzelbildung und damit die Aufnahme von pflanzlichen Nährstoffen. Bei RACE-1-Mutanten von Tabak ist eine Hemmung des Wurzelwachstums nicht beschrieben worden. Keimlingstests resistenter Linien zeigten bei AEC-Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  keine Hemmung der Wurzelbildung, während Wildtypkeimlinge abgestorben sind (Negrutiu et al., 1984). Drei auf AEC regenerierte Linien konnten molekularbiologisch eindeutig als plastidäre Transformanten charakterisiert werden (Linien C9, C21 und C48). Aufgrund der schlechten Regenerationsfähigkeit war nur bei Linie C21 genügend Pflanzenmaterial vorhanden, um biochemische Analysen durchzuführen. Im Unterschied zu den auf Spectinomycin selektierten Linien war der Gehalt an freiem Lysin in Linie C21 im Vergleich zum Wildtyp nur leicht erhöht. Während der Gehalt an freiem Lysin im Wildtyp in Abhängigkeit vom Alter des Blattgewebes von 96-227 nmolLysin/g Frischgewicht variierte, lag der Lysingehalt in dieser Linie bei 226 nmolLysin/g Frischgewicht. Bei diesem Ergebnis drängen sich zwei grundsätzliche Fragen auf:

1. Warum ist trotz plastidärer Integration des *dhdps-r1*-Gens und nachgewiesener Funktion des Transformationsvektors bei den mit Spectinomycin selektierten Transformanten der Lysingehalt in den mit AEC selektierten Transformanten so gering?

2. Wieso war es mit einem so geringem Gehalt an Lysin möglich, Transformanten mit einer AEC-Selektion zu regenerieren?

Bei Betrachtung des Selektionsschemas (siehe Abb.4.8) ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Selektion das Ausschalten der „feedback“-Inhibierung. Durch die erhöhte Lysinproduktion steht eine größere Menge an freiem Lysin zum Einbau in Polypeptide zur Verfügung. AEC wird somit mit einem geringeren Anteil eingebaut. Bei den selektierten Linien C9, C21 und C48 war der Stoffwechsel aufgrund der toxischen Wirkung von AEC sehr stark eingeschränkt. Trotzdem konnte bei Linie C21 die gleiche bzw. die 2-fache Konzentration im Blattgewebe (höchster und niedrigster Gehalt an freiem Lysin beim Wildtyp) im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden. Es wurde somit eine „normale“ Menge an freiem Lysin produziert, während andere Stoffwechselprodukte möglicherweise sehr stark reduziert waren. Dieser Gehalt an freiem Lysin in Linie C21 muss somit gerade zur erfolgreichen Selektion ausreichen. Eine zu geringe Lysinproduktion führt dagegen zum vermehrten Einbau des toxischen AEC in Polypeptide und damit zum Absterben der Pflanze. Dies könnte ein Grund für die zahlreichen mit AEC selektierten Linien sein, die bereits zu Beginn der Selektion abgestorben sind. Wahrscheinlich liegt dort das inserierte *dhdps-r1*-Gen nur in sehr wenigen Kopien im Plastom vor. Bei den zur Pflanze regenerierten Transformanten ist die Kopienzahl des *dhdps-r1*-Gens im Plastidengenom vermutlich höher. Als Folge ist eine gesteigerte DHDPS-Aktivität und ein höherer Gehalt an freiem Lysin zu beobachten (siehe Abb. 3.20). Die Nutzung des *dhdps*-Gens in Kombination mit dem Lysinanaloga AEC als plastidären Selektionsmarker ist ohne weitere regulatorische Eingriffe nur innerhalb eines sehr schmalen Selektionsfensters möglich. Vergleichbare Ergebnisse wurden in der Diplomarbeit von L. Schaeffer bei plastidären Transformationen von Tomate erzielt. Hier konnten eine resistente Tomatenpflanze und 4 resistente Kalli selektiert werden. Bei der Transformation von Kartoffelplastiden mit dem *dhdps-r1*-Gen konnten ebenfalls zahlreiche Linien selektiert werden. Der in dem Selektionstest ermittelte Bereich von 7,5-22,5  $\mu\text{M}$  AEC für Blattstücke erwies sich als angemessen. Bei keiner der selektierten Kartoffellinien konnte die Transformationskassette im Plastom nachgewiesen werden. Nur eine regenerierte Kartoffelpflanze war resistent gegenüber AEC, eine plastidäre Integration der Transformationskassette war aber nicht gegeben. Offenbar handelt es sich hierbei um eine Spontanmutante des *dhdps*-Gens im Kerngenom dieses Kartoffelklons. Ein Sequenzvergleich

zwischen dem *dhdps*-Gen des Klons und dem Wildtyp- *dhdps*-Gen wurde nicht durchgeführt. Im Vergleich zu Tabak und Tomate wurden bei Kartoffel deutlich weniger Transformationsexperimente durchgeführt. Bei einem vergleichbaren Umfang an Transformationen wäre es vermutlich möglich gewesen, plastidäre Transformanten zu erhalten.

In dieser Arbeit konnte erstmals ein plastidäres Selektionssystem etabliert werden, das universell, d.h. potentiell bei allen Pflanzenarten einsetzbar ist. Bei einer weiteren Optimierung der Selektionsbedingungen sollte es möglich sein eine größere Anzahl an Transformanten zu erhalten. Eine homoplastomische Integration eines insensitiven *dhdps*-Gens dürfte ohne weitere regulatorische Eingriffe in den Lysinana- oder Katabolismus nicht zu erreichen sein. Für eine Nutzung des *dhdps*-Gens als Markergen ist es aber nicht erforderlich einen homoplastomischen Zustand zu erreichen. Nach einer erfolgreichen Selektion wäre es sogar von Vorteil, wenn das Markergen durch Rekombinationsereignisse eliminiert wird. Bei antibiotikumhaltigen plastidären Markern wie z.B. dem *aadA*-Gen oder dem *aphA-6*-Gen ist eine zeitaufwendige Elimination beispielsweise durch ein *CRE-lox*-spezifisches Rekombinationssystem notwendig. Mit diesem neuen, auf dem Lysinanaloga AEC basierenden plastidären Selektionssystem könnte es für viele Pflanzenspezies möglich sein, komplexe Transformationsstrategien zu entwickeln.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde in zwei Bereiche gegliedert. Der erste Themenbereich beschäftigte sich mit der Transformation von pflanzlichen Mitochondrien bzw. mit den Voraussetzungen, die erfüllt sein müssen, um Mitochondrien höherer Pflanzen zu transformieren. Im zweiten Themenbereich wurde die Regulation der Lysinbiosynthese erstmals mit Hilfe der Plastidentransformation modifiziert sowie ein universeller plastidärer Selektionsmarker entwickelt und etabliert.

### Mitochondrientransformation

In dieser Arbeit wurden zwei Strategien zur Transformation von Mitochondrien höherer Pflanzen entwickelt. Zum einen wurde ein mitochondrienspezifischer Ansatz gewählt, d.h. es wurden Selektionsmarker verwendet, die eine hemmende Wirkung auf die Atmungskette der Mitochondrien besitzen. Zum anderen wurden in Anlehnung an seit die seit 1990 erfolgreich durchführbare Plastidentransformation generelle Inhibitoren der Proteinbiosynthese verwendet, welche durch die Produkte der entsprechenden in die Mitochondrien eingebrachten Resistenzgene detoxifiziert werden sollten.

### Markergenstrategie

Geeignete Selektionsbedingungen zur Identifizierung von mitochondrialen Transformanten wurden bei Tabakblättern und Tabakprotoplasten mit den Antibiotika Blastocidin, Chloramphenicol und Hygromycin als Hemmstoffe ermittelt. Aus Transformationen mit den mitochondrialen Transformationskassetten pBM*hph* II, pBM*hph* III und pBM*hph* IV konnten über 200 Hygromycin-resistente Linien selektiert und charakterisiert werden. PCR- und Southern-Analysen lassen bei mindestens 7 Linien eine zielgerichtete mitochondriale Integration des Transgens vermuten. Möglicherweise sind aber nur wenige Kopien des Transgens in das Mitochondriengenom inseriert bzw. repliziert worden, was eine eindeutige Charakterisierung erschwert. Bei einer großen Anzahl resistenter Linien handelt es sich wahrscheinlich um funktionelle zielortfremde Integrationen der Transformationskassetten in die Plastiden-, Kern- oder Mitochondriengenome.

### Mitochondrienspezifischer Transformationsansatz

Die in dieser Arbeit entwickelten mitochondrienspezifischen Transformationsvektoren pUM*myx* II, pUM*glu* II, pUM*arg* II und pUM*anti* II enthalten ein Fragment des mitochondrialen *cob*-Gens. In dieses *cob*-Fragment wurden Punktmutationen eingeführt, die zu einer Veränderung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des Apocytochroms *b* führen. Bei

einer korrekten homologen Integration dieses modifizierten *cob*-Fragmentes in das Mitochondriengenom sind die Inhibitoren Antimycin A, Myxothiazol und Moa-Stilben nicht mehr in der Lage, an den Komplex III der mitochondrialen Atmungskette zu binden. Zur Bestimmung optimaler Selektionsbedingungen von mitochondrialen Transformanten mit den Hemmstoffen Antimycin A, Myxothiazol und Moa-Stilben wurden Testreihen mit Tabakblättern, Tabakprotoplasten sowie Tabak- und Arabidopsis-Suspensionskulturen durchgeführt. Bei „particle-gun“-Transformationen von Tabakblättern mit der Transformationskassette pUMarg II wurden 23 Moa-Stilben-resistente Linien selektiert. Bei 18 Linien konnte eine Integration des mutierten *cob*-Fragmentes eindeutig per PCR und Sequenzierung nachgewiesen werden. Ob es sich dabei um eine mitochondriale Integration handelt, konnte nicht eindeutig belegt werden. In diesem Fall wäre jedoch zu klären, auf welchem Mechanismus der offensichtliche selektive Vorteil der mit dem Transformationsvektor transformierten Pflanzen beruht, da die Integration des *cob*-Gen-Fragmentes nur innerhalb des mitochondrialen Zielortes funktionell sein dürfte.

### **Plastidentransformation**

Bei dem plastidären Transformationsansatz dieser Arbeit wurden zwei Ziele verfolgt. Zum einen wurde der „feedback“-Regulationsmechanismus der DHDPS innerhalb des Aspartat-Stoffwechsels durch die Integration eines insensitiven *dhcps*-Gens in die Plastiden von Tabak und Kartoffel beeinträchtigt. Der Gehalt der essentiellen Aminosäure Lysin wird somit gesteigert. Zum anderen wurde das insensitive *dhcps*-Gen als Markergen genutzt, um eine Selektion von plastidären Transformanten auf dem Lysinanaloga AEC zu ermöglichen.

### **Erhöhung des Lysingehaltes**

Es konnten 34 Spectinomycin-resistente Tabakkclone selektiert werden, die mit der Transformationskassette pHoDh2b transformiert wurden. Die molekularbiologische Charakterisierung der Transformanten konnte bei 8 Linien eindeutig eine korrekte plastidäre Integration der Transgene belegen. Biochemische Analysen zeigen eine bis zu 32-fache Erhöhung an freiem Lysin im Blattgewebe von plastidären Transformanten. Es war damit erstmals mit der Plastidentransformation möglich, regulatorisch die Lysinbiosynthese zu verändern.

### **AEC als plastidärer Selektionsmarker**

AEC (S-Aminoethyl-L-Cystein) konkurriert als Lysinanaloga mit Lysin um den Einbau in Polypeptide. Wird die AEC-Konzentration im pflanzlichen Gewebe im Vergleich mit Lysin zu hoch, kommt es zum Erliegen des Stoffwechsels und damit zum Absterben der Zelle.

Durch die Überproduktion von Lysin in den Transformanten verschiebt sich das Verhältnis von AEC → Lysin. Es wird somit kompetitiv mehr Lysin in die Polypeptide eingebaut. Dies lässt sich als Selektionsvorteil nutzen. Mit dem „Markergen“ *dhdps-r1* und AEC als selektivem Hemmstoff wurden insgesamt 49 Tabaklinien selektiert. Bei 3 selektierten Linien konnte eindeutig die korrekte plastidäre Integration der Transformationskassette nachgewiesen werden. Es ist damit erstmals gelungen, einen antibiotikumfreien universell einsetzbaren plastidären Selektionsmarker zu etablieren. In weiteren Transformationsexperimenten konnten mit dem gleichen „Markergen“ plastidäre Tomatentransformanten identifiziert und charakterisiert werden (Diplomarbeit L. Schaeffer). Damit ist es bereits bei 2 Spezies gelungen, AEC als selektiven Hemmstoff einzusetzen. Bei weiterer Optimierung der Selektionsbedingungen dürfte es möglich sein, auch bei weiteren Pflanzenspezies diesen universellen Selektionsmarker zu etablieren.

## 6 Literatur

- Adams C.C., Stern D.B. (1990). Control of mRNA stability in chloroplasts by 3' inverted repeats: effects of stem and loop mutations on degradation of *psbA* mRNA *in vitro*. Nucl Acids Res 18:6003-6010
- Affourtit C., Whitehouse D.G., Moore A.L. (2000). Maesaquinone: a novel inhibitor of plant mitochondrial respiratory enzymes that react with ubiquinone. IUBMB Life 49 (6):533-7
- Andersson S.G., Zomorodipour A., Andersson et al. (1998). The genomesesquence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature 396:133-40.
- Akhmanova A., Voncken F., van Alen T., van Hoek A., Boxma B., Vogels G., Veenhuis M. and Hackstein J.H. (1998). A hydrogenosome with a genome. Nature 396:527-8
- Alton N.K., Vapnek D. (1979). Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. Nature 282 (5741):864-9
- Aubert D., Bisanz-Seyer C., Herzog M. (1992). Mitochondrial *rps14* is a transcribed and edited pseudogene in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol 20 (6):1169-74
- Ayliffe M.A., Timmis J.N. (1992). Plastid DNA sequence homologies in the tobacco nuclear genome. Mol Gen Genet. 236(1):105-12.
- Backert S., Kunnimalaiyaan M., Börner T., Nielsen B.L. (1998). In vitro Replication of Mitochondrial Plasmid mp1 from the Higher Plant *Chenopodium album* (L.): A Remnant of Bacterial Rolling Circle and Conjugative Plasmids ? J Mol Biol 284: 1005-1015
- Barkan A. (1989). Tissue-dependent plastid RNA splicing in maize: Transcripts from four plastid genes are predominantly unspliced in leave meristems and roots. Plant Cell 1:437-445
- Bartoszeweski G., Malepszy S., Havey M. (2004). Mosaic (MSC) cucumbers regenerated from independent cell cultures posses different mitochondrial rearrangements. Curr genet 45 (1):45-53
- Bendich A.J., Gauriloff L.P. (1984). Morphometric Analysis of Curcubit Mitochondria: the relationship between chondriome volume and DNA content. Protoplasma 119:1-7

- Bendich A.J. (1987). Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genom ? BioEssays 6:279-282
- Bennoun P., Delosme M., Kuck U. (1991). Mitochondrial genetics of *Chlamydomonas reinhardtii*: resistance mutations marking the cytochrome b gene. Genetics 127 (2):335-43.
- Bennoun P., Delosme M., Godehardt I., Kuck U. (1992). New tools for mitochondrial genetics of *Chlamydomonas reinhardtii*: manganese mutagenesis and cytoduction. Mol Gen Genet 234 (1):147-54
- Bhattacharya D., Medlin L. (1995). The phylogeny of plastids:A review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. J Phycol 31:489-98.
- Bhattacharya D., Helmchen T., Melkonian M. (1995). Molecular evolutionary analyses of nuclear-encoded small subunit ribosomal RNA identify an independent rhizopod lineage containing the Euglyphina and the Chlorarachniophyta. J Eukaryot Microbiol 42:65-9.
- Bhattacharya D., Schmidt H.A. (1997). Division Glaucocystophyta. In Origins of algae and their plastids, D. Bhattacharya ed. (Wien:Springer-Verlag) pp.139-148
- Bilang R., Iida S., Peterhans A., Potrykus I., Paszkowski J. (1991). The 3'-terminal region of the hygromycin-B-resistance gene is important for its activity in *Escherichia coli* and *Nicotiana tabacum*. Gene 100:247-50
- Binder S., Brennicke A. (1993a). A tRNA gene transcription initiation site is similar to mRNA and rRNA promoters in plant mitochondria. Nucleic Acids Res 21 (22):5012-9
- Binder S., Brennicke A. (1993b). Transcription initiation sites in mitochondria of *Oenothera berteriana*. J Biol Chem 268 (11):7849-55
- Binder S., Hatzack F., Brennicke A. (1995). A novel pea mitochondrial in vitro transcription system recognizes homologous and heterologous mRNA and tRNA promoters. J Biol Chem 270 (38):22182-9
- Birnboim H.C., Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acids Res 7:1513-1524

- Blickling S., Beisel H.G., Bozic D., Knäblein J., Laber B., Huber R. (1997). Structure of dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* reveals novel quaternary structure. *J Mol Biol* 274 (4):608-21
- Blickling S., Knäblein J. (1997). Feedback inhibition of dihydrodipicolinate synthase enzymes by L-lysine. *Biol Chem* 378 (3-4):207-10
- Blowers A.D., Ellmore G.S., Klein U., Bogorad L. (1990). Transcriptional analysis of endogenous and foreign genes in chloroplast transformants in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 2:1059-1070
- Bock R., Hermann M., Kössel H. (1996.) *In vivo* dissection of *cis*-acting determinants for plastid RNA editing. *EMBO J* 15:5052-5059
- Bock R. (2001). Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol* 312 (3):425-438.
- Bogograd L. (2000). Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol* 18 (6):257-263
- Bohner J.G., Chase C.D. (1997). *Nicotiana tabacum* apocytochrome *b* (*cob*) mRNA, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds; Genbank, Server NCBI, Accession U92011
- Bonnefoy N., Fox. (2001). Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods Cell Biol* 65:381-96
- Bonnefoy N., Fox. (2002). Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods Enzymol* 350:97-111
- Bousquet I., Dujardin G., Poyton R.O., Slonimski P.P. (1990). Two group I mitochondrial introns in the *cob*-box and *coxI* genes require the same MRS1/PET157 nuclear gene product for splicing. *Curr Genet* 18 (2):117-24
- Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Hosler J.P., Johnson A.M., Jones A.R., Randolph-Anderson B.L., Robertson D., Klein T.M., Shark K.B., Sanford J.C. (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240:1534-1537

- Boynton J.E., Gillham N.W. (1996). Genetics and transformation of mitochondria in the green alga *Chlamydomonas*. *Methods Enzymol* 264:279-96
- Brandt P., Unseld M., Eckert-Ossenkopp U., Brennicke A. (1993). An *rps14* pseudogene is transcribed and edited in *Arabidopsis* mitochondria. *Curr Genet* 24 (4):330-6
- Brasseur R. (1988). Calculation of the three-dimensional structure of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b inserted in a lipid matrix. *J Biol Chem* 263 (25):12571-5
- Brenner E.D., Matinez-Barboza N., Clark A.P., Liang Q.S., Stevenson D.W., Coruzzi G.M. (2000). *Arabidopsis* mutants resistant to S(+)-beta-methyl-alpha, beta-diaminopropionic acid, a cycad-derived glutamate receptor agonist. *Plant Physiol* 124 (4):1615-24
- Bright S.W., Fetherstone L.C., Mifflin B.J. (1979). Lysine metabolism in a barley mutant resistant to S-aminoethylcysteine. *Planta* 146:629-633
- Brock R.D., Friederich E.A., Landgridge J. (1973). The modification of amino acid composition of higher plants by mutation and selection. In: nuclear techniques for seed protein improvement. Int Atomic Energy Agency, Vienna pp 328-338
- Brunner A., Mendoza R.V., Tuena de Cobos A. (1987). Extrachromosomal genetics in the yeast *Kluyveromyces lactis*. Isolation and characterisation of antimycin-resistant mutants. *Curr Genet* 11: 475-482
- Bryan J.K. (1980). Synthesis of the aspartate family and branched-chain amino acids. In B.J. Milfin (eds); *The Biochemistry of Plants, Amino Acids and Derivates*. Academic Press, New York, Vol 5 pp 403-452
- Bui E.T., Bradley P.J. and Johnson P.J. (1996). A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9651-6.
- Burger G., Lang B., Bandlow W., Kaudewitz F. (1975). Studies on the mechanism of electron transport in the bc1-segment of the respiratory chain in yeast. II. The binding of antimycin to mitochondrial particles and the function of two different binding sites. *Biochim Biophys Acta* 396 (2):187-201
- Burger G., Lang B., Bandlow W., Schweyen R.J., Backhaus B., Kaudewitz F. (1976). Antimycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: a new mutation on the mtDNA conferring

antimycin resistance on the mitochondrial respiratory chain. *Biochem Biophys Res Commun* 72 (3):1201-8

Butow R.A., Henke R.M., Moran J.V., Belcher S.M., Perlman P.S. (1996). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria using the biolistic gun. *Methods Enzymol* 264:265-78

Carrer H., Hockenberry T.N., Svab Z., Maliga P. (1993). Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Mol Gen Genet* 241 (1-2):49-56

Cavalier-Smith T. (1987). The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts and microbodies. *Ann N.Y. Acad Sci* 503:55-71

Cavalier-Smith T., Couch J.A., Thorsteinsen K.E., Gilson P.R., Deane J.A., Hill D.R. and McFadden G.I. (1996). Cryptomonad nuclear and nucleomorph 18S rRNA phylogeny. *European Journal of Phycology* 31d, 315-328

Cermakian N., Ikeda T.M., Cedergren N., Gray M.W. (1996). Sequences homologous to yeast mitochondrial and bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases are widespread throughout the eukaryotic lineage. *Nucleic Acids Res* 24 (4):648-54

Chen W., Dieckmann C.L. (1997). Genetic evidence for interaction between Cbp1 and specific nucleotides in the 5' untranslated region of mitochondrial cytochrome b mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17 (11):6203-11

Chen W., Islas-Osuna M.A., Dieckmann C.L. (1999). Suppressor analysis of mutations in the 5'-untranslated region of COB mRNA identifies components of general pathways for mitochondrial mRNA processing and decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 151 (4):1315-25

Chetrit P., Rios R., De Paepe R., Vitart V., Gutierrez S., Vedel F. (1992). Cytoplasmic male sterility is associated with large deletions in the mitochondrial DNA of two *Nicotiana sylvestris* protoclones. *Curr Genet* 21 (2):131-7

Clark C.G. and Roger A.J. (1995). Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6518-21

Collin M., Dorthu M.P., Duby F., Remacle C., Dinant M., Wolwertz M.R., Duyckaerts C., Sluse F., Matagne R.F. (1995). Mutations affecting the mitochondrial genes encoding the

cytochrome oxidase subunit I and apocytochrome b of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet* 249 (2):179-84

Coria R., García M., Brunner A. (1989). Mitochondrial cytochrome *b* genes with a six-nucleotide deletion or single-nucleotide substitutions confer resistance to antimycin A in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol Microbiol* 3:1599-1604

Corneille S., Lutz K., Svab Z., Maliga P. (2001). Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system. *Plant J* 27 (2):171-178.

Covello P.S., Gray M.W. (1992). Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit 2 of cytochrome c oxidase (*coxII*) in soybean: evidence for RNA-mediated gene transfer. *EMBO J* 11:3815- 3820

Dale E.C., Ow D.W. (1991). Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (23):10558-62

Daniell H., Datta R., Varma S., Gray S., Lee S.B. (1998). Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat Biotechnol* 16 (4):345-8

Daniell H., Muthukumar B., Lee S.B. (2001). Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet* 39 (2):109-116.

Daniell H., Dhingra A. (2002). Multigene engineering: dawn of an exciting new era in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13 (2):136-141

Danon A. (1997). Translational regulation in the chloroplast. *Plant Physiol.* 115: 1293-1298

De Cosa B., Moar W., Lee S.B., Miller M., Daniell H. (2001). Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol* 19 (1):71-74.

Delwiche C.F. and Palmer J.D. (1997). The origin of plastids and their spread via secondary endosymbiosis. In: *Origins of algae and their plastids*, Bhattacharya (ed), Springer Verlag, Wien, pp.53-86

Deng X.W., Gruissem W. (1987). Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcription regulation. *Cell* 49:379-387

- DeCosa B., Moar W., Lee S.B., Miller M., Daniell H. (2001). Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol* 19 (1):71-4
- Demain A.L. (1975). Overproduction of microbial metabolites and enzymes due to alteration of regulation. In: Ghose T.K., Fischer A. (eds); *Adv Biochem Engin*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York; vol I. pp 113-142
- DeSantis-Maciossek G., Kofer W., Bock A., Schoch S., Maier R.M., Wanner G., Rüdiger W., Koop H.U., Hermann R.G. (1999). Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes rpoA, B and C1: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *The Plant Journal* 18:477-489
- Di Rago J.P., Colson A.-M. (1988). Molecular Basis for Resistance to Antimycin and Diuron, Q-Cycle Inhibitors Acting at the Q<sub>i</sub> Site in the Mitochondrial Ubiquinol-Cytochrome c Reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 263:12564-12570
- Di Rago J.P., Coppée J.-Y., Colson A.-M. (1989). Molecular Basis for Resistance to Myxothiazol, Mucidin (Strobilurin A), and Stigmatellin. *J Biol Chem* 264:14543-14548
- Dombrowski S., Hoffmann M., Guha C., Binder S. (1999). Continuous primary sequence requirements in the 18-nucleotide promoter of dicot plant mitochondria. *J Biol Chem* 274 (15):10094-9
- Dorvzhenko A., Bergen U., Koop H.U. (1998). Thin alginate layer technique for protoplast culture of tobacco leaf protoplasts: shoot formation in less than two weeks. *Protoplasma* 204:114-118
- Douglas S.E., Murphy C.A., Spencer D.F. and Gray M.W. (1991). Cryptomonad algae are evolutionary chimaeras of two phylogenetically distinct unicellular eukaryotes. *Nature* 350:148-51.
- Douglas S.E. (1994). Chloroplast Origins and Evolution. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, D.A. Bryant (ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 91-118.
- Douglas S.E. (1998). Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev* 8:655-661

- Duby F., Mantagne R.F. (1999). Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mitochondrial DNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking cob, nd4, and the 3' end of nd5. *Plant Cell* 11 (1):115-25
- Dutton G. (1999). Computational genomics: the medicine of the future? *Ann Intern Med* 131 (10):801-4
- Eibl C., Zou Z., Beck A., Koop H.U. (1999). *In vivo* analysis of plastid *psbA*, *rbcL* and *rpl32* UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant J.* (3):333-45
- Ellis J. (1982). Promiscuous DNA: chloroplast genes inside plant mitochondria. *Nature* 299:678-679
- Endo T., Kobayashi K., Nakayama N., Tanaka T., Kamakura T., Yamaguchi I. (1988). Inactivation of blasticidin S by *Bacillus cereus* II. Isolation and characterisation of a plasmid, pBSR8 from *Bacillus cereus*. *J Antibiot* 41:271-273
- Esposti D.M., Ghelli A., Butler G., Roberti M., Mustich A., Cantatore P. (1990). The cytochrome b of the sea urchin *Paracentrotus lividus* is naturally resistant to myxothiazol and mucidin. *FEBS Lett* 263 (2):245-7
- Esposti D.M., DeVries S., Crimi M., Ghelli A., Partanello T., Meyer A. (1993). Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1143 (3):243-71
- Falco S.C., Guida T., Locke M., Mauvais J., Sanders C., Ward R.T., Webber P. (1995). Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Biotechnology (NY)* 13 (6):577-82
- Fernández-González C., Gil J.A., Mateos L.M., Schwarzer A., Schäfer A., Kalinowski J., Pühler A. und Martin J.F. (1996). Construction of L-lysine overproducing strains of *Brevibacterium lactofermentum* by targeted disruption of the *hom* and *thrB* genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:554-558
- Fey J., Marechal-Drouard L. (1999). Expression of the two chloroplast-like tRNA(Asn) genes in potato mitochondria: mapping of transcription initiation sites present in the trnN1-trnY-nad2 cluster and upstream of trnN2. *Curr Genet* 36 (1-2):49-54

- Finnegan P.M., Brown G.G. (1990). Transcriptional and post-transcriptional regulation of RNA levels in maize mitochondria. *The Plant Cell* 2:71-83
- Fox T.D., Sanford J.C., McMullin T.W. (1988). Plasmids can stably transform yeast mitochondria lacking endogenous mtDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7288-7292
- Frankard V., Ghislain M., Jacobs M. (1992). Two Feedback-Insensitive Enzymes of the Aspartate Pathway in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol* 99:1285-1293
- Fukuchi M., Shikanai T., Kossykh V.G., Yamada Y. (1991). Analysis of nuclear sequences homologous to the B4 plasmid-like DNA of rice mitochondria. Evidence for sequence transfer from mitochondria to nuclei. *Curr Genet.* 20(6):487-94
- Fütterer J. (1995). Enzyme Assays for  $\beta$ -Glucuronidase. In: Potrykus I, Spangenberg G (eds) *Gene transfer in plants*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 75-82
- Galili G. (1995). Regulation of Lysine and Threonine Synthesis. *Plant Cell.* 7 (7):899-906
- Galili G., Hoefgen R. (2001). Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. *Metabolic Engineering*, Academic Press pp 1-9
- Galili G., Tang G., Zhu X., Gakiere B. (2001). Lysine catabolism: a stress and development super-regulated metabolic pathway. *Curr Opin Plant Biol* 4 (3):261-6
- Geier B.M., Schagger H., Brandt U., Colson A.M., von Jagow G. (1992). Point mutation in cytochrome b of yeast ubihydroquinone:cytochrome-c oxidoreductase causing myxothiazol resistance and facilitated dissociation of the iron-sulfur subunit. *Eur J Biochem* 208 (2):375-80
- Germot A., Philippe H. and LeGuyader H. (1996). Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14614-7
- Ghislain M., Frankard V., Jacobs M. (1990). Dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris*, a chloroplast-localized enzyme of the lysin pathway. *Planta* 180:480-486
- Ghislain M., Frankard V., Jacobs M. (1995). A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. *Plant J* 8 (5):733-43

- Giessler A., Geier B.M., de Rago J.P., Slonimski P.P., von Jagow G. (1994). Analysis of cytochrome-b amino acid residues forming the contact face with the iron-sulfur subunit of ubiquinol:cytochrome-c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 222 (1):147-54
- Glassmann K.F. (1992). A molecular approach to elevating free lysine in plants. In: *Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*, Singh B.K., Flores H.E., Shannon J.C. (eds); American Society of Plant Physiologists pp 217-228
- Gleave A.P., Mitra D.S., Mudge S.R., Morris B.A. (1999). Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol Biol* 40 (2):223-35
- Golds T.J., Maliga P. and Koop H.U. (1993). Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Biotech* 11:95-97
- Goldschmidt-Clermont M. (1991). Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucl Acids Res* 19:4083-4089
- Gräfe U. (1992). *Biochemie der Antibiotika*. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, New York
- Gray M.W. (1988). Organelle origins and ribosomal RNA. *Biochem Cell Biol* 66:325-333
- Gray M.W. (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet* 5:294-299
- Gray M.W. (1992). The endosymbiont hypothesis revised. *Int Rev Cytol* 141:233-357
- Gray M.W., Pamela J., Hanic-Joyce, Covello P.S. (1992). Transcription, processing and editing in plant mitochondria. *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol* 43:145-175
- Gray W.G., Burger G., Lang B.F. (1999). Mitochondrial Evolution. *Science* 283:1476-1481
- Gray M.W. and Spencer D.F. (1996). Organellar evolution. In: *Evolution of microbial life*, D.M.Roberts, P.Sharp, G.Alderson and M.Collins (eds), Cambridge Univ.Press, Cambridge, pp 107-26.

- Grill L. K., Garger S. J. (1981). Identification and characterisation of double-stranded RNA associated with cytoplasmic male-sterility in *Vicia faba*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7043-7046
- Gritz L., Davies J. (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 25 (2-3):179-88
- Gu J., Miles D., Newton K.J. (1993). Analysis of Leaf Sectors in the NCS6 Mitochondrial Mutant of Maize. Plant Cell 5 (8):963-971
- Gualberto J.M., Wintz H., Weil J.H., Grienenberger J.M. (1988). The genes coding for subunit 3 of NADH dehydrogenase and for ribosomal protein S12 are present in the wheat and maize mitochondrial genomes and are co-transcribed. Mol Gen Genet 215 (1):118-27
- Gualberto J.M., Bonnard G., Lamattina L., Grienenberger J.M. (1991). Expression of the wheat mitochondrial nad3-rps12 transcription unit: correlation between editing and mRNA maturation. Plant Cell 3 (10):1109-20
- Gutierrez S., Lelandais C., Paeppe R.D., Vedel F., Chetrit P. (1997). A mitochondrial substoichiometric orf87-nad3-nad1 exonA co-transcription unit present in *Solanaceae* was amplified in the genus *Nicotiana*. Curr Genet 31 (1):55-62
- Hagemann R., Scholz F. (1962). Ein Fall Gen-induzierter Mutationen des Plasmotyps bei Gerste. Der Züchter 32:50-59
- Hager M., Bock R. (2000). Enslaved bacteria as new hope for plant biotechnologists. Appl Microbiol Biotechnol 54 (3):302-10
- Hajdukiewicz P.T., Gilbertson L., Staub J.M. (2001). Multiple pathways for Cre/lox mediated recombination in plastids. Plant J 27 (2):161-170.
- Håkansson G., Glimelius K., Bonnett H.T. (1990). Respiration in Cells and Mitochondria of Male-Fertile and Male-Sterile *Nicotiana spp.* Plant Physiol. 93: 367-373
- Hallick R.B., Hong L., Drager R.G., Favreau M.R., Monfort A., Orsat B., Spielmann A. and Stutz E. (1993). Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. Nucleic Acids Res 21, 3537-44.

- Hashimoto T., Sanchez L.B., Shirakura T., Müller M. and Hasegawa M. (1998). Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6860-5.
- Havey M.J., Lilly J.W., Bohanec B., Bartoszewski G., Malepszy S. (2002). Cucumber: a model angiosperm for mitochondrial transformation ? *J Appl Genet* 43 (1):1-17
- Häuber M.M., Müller S.B., Speth V. and Maier U.G. (1994). How to evolve a complex plastid?-A hypothesis. *Botanica Acta* 107:383-386
- Hedtke T., Börner T., Weihe A. (1997). Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* 277 (5327):809-11
- Hedtke B., Wagner I., Börner T., Hess W.R. (1999). Inter-organellar crosstalk in higher plants: impaired chloroplast development affects mitochondrial gene and transcript levels. *Plant J* 19 (6):635-43
- Heifertz P.B. (2000). Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie* 82:655-666
- Hemleben V. (1990). *Molekularbiologie der Pflanzen*. Eugen Ulmer Verlag Stuttgart
- Herrmann R. G. (1992). *Cell Organelles*. Springer Verlag, Wien New York
- Hess W.R., Schendel R., Rüdiger W., Fieder B., Börner T. (1992). Components of chlorophyll biosynthesis in a barley albina mutant unable to synthesize d-aminolevulinic acid by utilizing the transfer RNA for glutamic acid. *Planta* 188:19-27
- Hess W.R., Prombona A., Fieder B., Subramanian A.R., Börner T. (1993). Chloroplast rps15 and the rpoB/C1/C2 gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast encoded RNA polymerase. *EMBO J* 12:563-571
- Hess W.R., Hübschmann T., Börner T. (1994a). Ribosome-deficient plastids of albostrians barley: extreme representatives of non-photosynthetic plastids. *Endocytobiosis Cell Res* 10:65-80
- Hess W.R., Hoch B., Zeltz P., Hübschmann T., Kössel H., Börner T. (1994b). Inefficient rpl2 splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell* 6:1455-1465

- Hess W.R., Müller A., Nagy F., Börner T. (1994c). Ribosome-deficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: genetic evidence for a plastid-derived signal. *Mol Gen Genet* 242:305-312
- Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R., Ishibashi T., Sakamoto M., Mori M., Kondo C., Honji Y., Sun C.R., Meng B.Y. (1989). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet* 217:185-94
- Hirt R.P., Healy B., Vossbrinck C.R., Canning E.U. and Embley T.M. (1997). A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that *microsporidia* once contained mitochondria. *Curr Biol* 7:995-998
- Hoffmann M., Dombrowski S., Guha C., Binder S. (1999). Cotranscription of the rpl5-rps14-cob gene cluster in pea mitochondria. *Mol Gen Genet* 261 (3):537-45
- Houmiel K.L., Slater S., Broyles D., Casagrande L., Colburn S., Gonzales K., Mitsky T.A., Reiser S.E., Shah D., Taylor N.B., Tran N., Valentin H.E., Gruys K.J. (1999). Poly(beta-hydroxybutyrate) production in oilseed leukoplasts of brassica napus. *Planta*. 209 (4):547-50
- Howell N., Gilbert K. (1988). Mutational analysis of the mouse mitochondrial cytochrome b gene. *J Mol Biol* 203 (3):607-18
- Huang F.C., Klaus S.M., Hertz S., Zou Z., Koop H.U., Golds T.J. (2002). Efficient plastid transformation in tobacco using the aphA-6 gene and kanamycin selection. *Mol Genet Genomics* 268 (1):19-27
- Ishida K., Cao Y., Hasegawa M., Okada N. and Hara Y. (1997). The origin of chlorarachniophyte plastids, as inferred from phylogenetic comparisons of amino acid sequences of EF-Tu. *J Mol Evol* 45:682-687
- Ito K. (1999). Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Plant Science* 149:167-173

Jacobs M., Frankard V., Ghislain M., Vauterin M. (1999). The genetics of aspartate derived amino acids in higher plants. In Singh B.J. (eds) *Plant Amino Acids; Biochemistry and Biotechnology*; Marcel Dekker INC. New York, Basel, Hong Kong pp 29-50

Jefferson R.A., Burgess S.M., Hirsh D. (1986).  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8447-8451

Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987). Gus fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907

Johnston S.A., Anziano P.Q., Shark K., Sanford J.C., Butow R.A. (1988). Mitochondrial transformation in yeast by bombardement with microprojectiles. *Science* 240:1538-1541

Jung R., Carl F. (2000). Transgenic corn with an improved amino acid composition. Paper presented at the 8<sup>th</sup> International Symposium on Plant Seeds. Gatersleben, Germany

Kaleikau E.K., Andre C.P., Walbot V. (1992). Structure and expression of the rice mitochondrial apocytochrome b gene (cob-1) and pseudogene (cob-2). *Curr Genet* 22 (6):463-70

Kamakura T., Yoneyama K., Yamaguchi I. (1990). Expression of the blasticidin S deaminase gene (bsr) in tobacco: fungicide tolerance and a new selective marker for transgenic plants. *Mol Gen Genet* 223 (2):332-4

Keeler S.J., Maloney C.L., Webber P.Y., Patterson C., Hirata L.T., Falco S.C., Rice J.A. (1997). Expression of de novo high-lysine alpha-helical coiled-coil proteins may significantly increase the accumulated levels of lysine in mature seeds of transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol* 34 (1):15-29

Khan M.S., Maliga P. (1999). Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol* 17 (9):910-5

Kickuchi Y., Kojima H., Tanaka T. (1999). Mutational analysis of the feedback sites of lysine-sensitive aspartokinase of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 173 (1):211-5

Kim J., Klein P.G., Mullet J.E. (1994). Synthesis and turnover of photosystem II reaction center protein D1. *J Biol Chem* 269:17918-17923

Klein T.M., Wolf E.D., Wo R., Sanford J.C. (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73

Kofer W., Glimelius K., Bonnett H.T. (1991). Modifications of Mitochondrial DNA Cause Changes in Floral Development in Homeotic-like Mutants of Tobacco. *Plant Cell* 3 (8):759-769

Kofer W., Koop H.U., Wanner G., Steinmüller K. (1998a). Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation. *Mol Gen Genet* 258:166-73

Kofer W., Eibl C., Steinmüller K., Koop H.U. (1998b). PEG-mediated plastid transformation in higher plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34:303-309

Koop H.U., Kofer W. (1995). Plastid transformation by polyethylene glycol treatment of protoplasts and regeneration of transplastomic plants. In: Potrykus I, Spangenberg G (eds) *Gene transfer in plants*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 75-82

Kota M., Daniell H., Varma S., Garczynski S.F., Gould F., Moar W.J. (1999). Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (5):1840-1845.

Kowallik K.V., Herrmann R.G. (1972). Variable amounts of DNA related to the size of chloroplasts. IV. Three-dimensional arrangement of DNA in fully differentiated chloroplasts of *Beta vulgaris* *J Cell Sci* 11:357-377

Kowallik K. (1994). From endosymbionts to chloroplasts: evidence for a single prokaryotic/eukaryotic endocytobiosis. *Endocytobiology & Cell Research* 10:137-149

Kraiczky P., Haase U., Gencic S., Flindt S., Anke T., Brandt U., von Jagow G. (1996). The molecular basis for the natural resistance of the cytochrome bc1 complex from strobilurin-producing basidiomycetes to center Qp inhibitors. *Eur J Biochem* 235 (1-2):54-63

Kruse O., Zheleva D., Barber J. (1997). Stabilization of photosystem two dimers by phosphorylation: implication for the regulation of the turnover of D1 protein. *FEBS Lett* 408:276-80

- Kuroiwa T., Suzuki T., Ogawa K., Kawano S. (1981). The chloroplast nucleus: Distribution, number, size, and shape, and a model for the multiplication of the chloroplast genome during development. *Plant Cell Physiol* 22:381-396
- Kwiatowska M. (1981). Lack of duplication of the number of total volume of mitochondria in cell cycle of antheridial filaments of *Chara vulgaris* L.. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)* 19 (4):229-38
- Lam H.M., Chiu J., Hsieh M.H., Meisel L., Olivera I.C., Shin M., Coruzzi G. (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 396 (6707):125-126
- Lamppa G.K., Bendich A.J. (1984). Changes in mitochondrial DNA levels during development of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 162:463-468
- Lang B.F., Burger G., O'Kelly C.J., Cedergren R., Golding G.B., Lemieux C., Sankoff D., Turmel M. and Gray M.W. (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387:493-497
- Lea P.J., Mills W.R., Milfin B.J. (1979). The isolation of a lysine-sensitive aspartate kinase from pea leaves and its involvement in homoserine biosynthesis in isolated chloroplasts. *FEBS Lett* 98 (1):165-168
- Leaver C.J. (1989). Structure and function of the mitochondrial genome in relation to cytoplasmic male sterility. *Vortr. Pflanzenzüchtung* 16, 379- 390
- Lee T.X., Metzger S.U., Cho Y.S., Whitmarsh J., Kallas T. (2001). Modification of inhibitor binding sites in the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex by directed mutagenesis of cytochrome *b(6)* in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Biochim Biophys Acta* 1504 (2-3):235-47
- Li X., Huff E.J., Hanice-Joyce P.J., Ellis S.R. (1993). Derivatives of the yeast mitochondrial ribosomal protein MrpS28 replace ribosomal protein S15 as functional components of the *Escherichia coli* ribosome. *J Mol Biol* 233 (4):606-14
- Lin S., Wu H., Jia H., Zhang P., Dixon R., May G., Gonzales R. Roe B.A. (2003). *Medicago truncatula* chloroplast, complete genome, complete sequence. Department Of Chemistry And Biochemistry, The University Of Oklahoma, USA

- Lössl A., Eibl C., Harloff H.J., Jung c., Koop H.U. (2003). Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum L.*): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep.*21 (9):891-9
- Loiseaux S., Mache R. and Rozier C. (1975). Rifampicin inhibition of the plastid rRNA synthesis of *Marchantia polymorpha*. *J Cell Sci* 17:327-35.
- Loiseaux-de Goer S. (1994). Plastid lineages. In: Progress in phycological research, F.E. Round and D.J. Chapman (eds), Biopress, Ltd, Bristol, U.K, pp.138-77.
- Lonsdale D.H., Grienenberger J.M. (1996). The mitochondrial genome of plants. In: Jauhar, P. P. eds. (1996): Methods of genome analysis in plants. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokio
- Maier U.G., Hofmann C.J., Eschbach S., Wolters J. and Igloi G.L. (1991). Demonstration of nucleomorph-encoded eukaryotic small subunit ribosomal RNA in cryptomonads. *Mol Gen Genet* 230, 155-60
- Maier R.M., Neckermann K., Igloi G.L., Kossel H. (1995). Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol* 251:614-28
- Mannschedel A. (1989). Molecularbiologische Charakterisierung der cytoplasmatischen männlichen Sterilität von Schnittlauch (*Allium schoenoprasum L.*). Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hannover
- Margulis L. (1970). Origin of eukaryotic cells, Yale University Press, New Haven, Connecticut.
- Margulis L. (1981). Symbiosis and Cell Evolution. Freeman, San Francisco
- Marienfeld J.R., Gu J., Newton K.J. (1993). PCR-mediated detection of heteroplasmy in maize mitochondrial mutants. *PCR Methods Appl* 3 (3):205-7
- Martin W., Schnarrenberger C. (1997). The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr Genet* 32 (1):1-18

- Martin W. and Müller M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392:37-41.
- Martin W., Stöbe B., Goremykin V., Hansmann M., Hasegawa M. and Kowallik K.V. (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393:162-165
- Matthews B.F., Widholm J.M. (1978). Expression of aspartokinase, dihydrodipicolinic acid synthase and homoserine dehydrogenase during growth of carrot cell suspension cultures on lysine- and threonine-supplemented media. *Z Naturforsch* 34 (2):1177-85
- Matthews B.F., Shye S.C., Widholm J.M. (1980). Mechanism of resistance of a selected carrot cell suspension culture to S-aminoethylcysteine. *Z Pflanzenphysiol* 96:453-463
- McBride K., Schaaf D.J., Daley M., Stalker D.M. (1994). Controlled expression of plastid transgenes in plants based on a nuclear DNA-encoded and plastid targeted T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7301-7305
- McBride K., Svab Z., Schaaf D.J., Hogan P.S., Stalker D.M., Maliga P. (1995). Amplification of a chimeric bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotech* 13:362-375
- McFadden G.I. (1993). Second-hand chloroplasts: evolution of cryptomonad algae. *Advances in Botanical Research* 19, 189-230
- McFadden G.I., Gilson P.R., Hofmann C.J., Adcock G.J. and Maier U.G. (1994). Evidence that an amoeba acquired a chloroplast by retaining part of an engulfed eukaryotic alga. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3690-4
- McFadden G.I., Gilson P.R. and Waller R.F. (1995). Molecular phylogeny of *chlorarachniophytes* based on plastid rRNA and rbcL sequences. *Archiv für Protistenkunde* 145, 231-239
- Melkonian M., Marin B. and Surek B. (1995). Phylogeny and evolution of the algae. In *Biodiversity and Evolution*, R.Arai, M.Kato and Y.Do, (eds), Tokyo: The National Science Museum Foundation pp 153-176
- Melkonian M. (1996). Systematics and evolution of the algae: Endocytobiosis and evolution of the major algal lineages. *Progress in Botany* 58:281-311

- Mereschkowsky C. (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreich. Biol Zentr 25:593-604
- Mereschkowsky C. (1910). Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenesis, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. Biol Zentrum 30:278-303, 321-347, 353-367
- Miao S., Ducan D.R., Widholm L.M. (1988). Selection of regenerable maize callus cultures resistant to 5-methyl-DL-tryptophane, Saminoethylcysteine and high levels of L-lysine plus threonine. Plant Cell Tissue Org Cult 14:3-14
- Michaelis G., Pratje E. (1977). Mapping of the two mitochondrial antimycin A resistance loci in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet 156 (1):79-85
- Michaelis U., Korte A., Rodel G. (1991). Association of cytochrome b translational activator proteins with the mitochondrial membrane: implications for cytochrome b expression in yeast. Mol Gen Genet 230 (1-2):177-85
- Morikami A., Nakamura K. (1987). Structure and expression of pea mitochondrial F1ATPase alpha-subunit gene and its pseudogene involved in homologous recombination. J Biochem (Tokyo) 101 (4):967-76
- Müller M. (1993). The hydrogenosome. J Gen Microbiol 139:2879-89
- Mullet J.E., Klein R.R. (1987). Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. EMBO J 6: 1571-1579
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl Acids Res 8:4321-4325
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Nawrath C., Poirier Y., Somerville C. (1994). Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. Proc Natl Acad Sci USA 91 (26):12760-4
- Nakayama Y., Shimanuki K., Sakakibara H., Murata M., Sannomiya T. (1966). Fungal antigens and skin tests. Arerugi 15 (7):567-73

- Nakazono M., Itadani H., Wakasaki T., Tsutsumi N., Sugiura M., Hirai A. (1995). The rps3-rpl16-nad3-rps12 gene cluster in rice mitochondrial DNA is transcribed from alternative promoters. *Curr Gene.* 27 (2):184-9
- Negrutiu I., Cattoir-reynearts A., Jacobs M. (1978). Selection and characterization of cell lines of *Arabidopsis thaliana* resistant to amino acid analogs. *Arch Int Physiol Biochim.* 86 (2):442-3
- Negrutiu I., Cattoir-reynearts A., Verbruggen I., Jacobs M. (1984). Lysine overproducer mutants with altered dihydrodipicolinate synthase from protoplast culture of *Nicotiana sylvestris*. *Theor Appl Genet* 68:11-20
- Newton K.J. (1988). Plant mitochondrial genomes: organisation, expression and variation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 503- 532
- Nickelsen J., Link G. (1993). The 54 kDa RNA-binding protein from mustard chloroplasts mediates endonucleolytic transcript 3' end formation *in vivo*. *Plant J* 3: 537-544
- Ñopo L., Borda A., Yactayo J., Frankard V., Jacobs M., Ghislain M. (2001). Expression of the DHDPS-R1 Gene in Potato confers resistens to the lysine analog S-aminoethylcystein (AEC). IV Latin Meeting on Plant Biotechnolgy (REDBIO 2001); Goiás, Brasil
- Nugent J. M., Palmer J. D. (1991). RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* 66, 473- 481
- Ogihara Y., Isono K., Kojima T., Endo A., Hanaoka M., Shiina T., Terachi T., Utsugi S., Murata M., Mori N., Takumi S., Ieko K., Gojobori T., Murai R., Matsuoka Y., Ohnishi Y., Tajiri H., Tsunewaki K. (2002). Structural features of a wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. *Mol Genet Gen* 266 (5):740-6
- O'Neill D., Horvath G.V., Horvath E., Dix P.J., Medgyesy P. (1993). Chloroplast transformation in plants: Polyetyhlene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant J* 3:729-738
- Ortega V.M., Bohner J.G., Chase C.D. (2000). The tobacco apocytochrome b gene predicts sensitivity to the respiratory inhibitors antimycin A and myxothiazol. *Curr Genet* 37 (5):315-21

- Pearson G.G., Timmis J.N., Ingele J. (1974). The differential replication of DNA during plant development. *Chromosoma* 45:281-294
- Perl A., Galili G., Shaul O. (1992). Regulation of lysine synthesis in transgenic potato plants expressing a bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. *Plant Mol Biol* 19 (5):815-23
- Perl A., Galili S., Shaul O., Ben-Tzvi I., Galili G. (1993). Bacterial Dihydrodipicolinate Synthase and Desensitized Aspartate Kinase: Two Novel Selectable Markers for Plant Transformation. *Bio/Technology* 11, 715-718
- Pirson A., Zimmermann M.H., Douce R., Day D.H. (1985). *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 18:202-243, Springer-Verlag, Berlin, New York
- Platenik J., Kuramoto N., Yoneda Y. (2000). Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci* 67 (4):335-64
- Pörs Y. (1999). Anpassung von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum L.*) an Licht- und Chlorophyllmangel. Diss. an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt Universität Berlin
- Possingham J.V., Rose R.J. (1976). Chloroplast replication and chloroplast DNA synthesis in spinach leaves. *Proc R Soc Lond [Biol]* 193:295-305
- Randolph-Anderson B.L., Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Johnson A.M., Dorthu M., Matagne R.F. (1993). Further characterization of the respiratory deficient dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol Gen Genet* 236 (2-3):235-44
- Rao R.N., Allen N.E., Hobbs J.N., Alborn W.E., Kirst H.A., Paschal J.W. (1983). Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 24 (5):689-695
- Richter G. (1996). *Biochemie der Pflanzen*. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York
- Roger A.J., Svard S.G., Tovar J., Clark C.G., Smith M.W., Gillin F.D. and Sogin M.L. (1998). A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:229-34

- Rognes S.E., Lea P.J., Milfin B.J. (1980). S-adenosylmethionine--a novel regulator of aspartate kinase. *Nature* 287 (5780):357-9
- Ruf S., Hermann M., Berger I.J., Carrer H., Bock R. (2001). Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol* 19 (9):870-5
- Saalaoui E., Litvak S., Araya A. (1990). The apocytochrome b from an alloplasmic line of wheat (*T.aestivum*, cytoplasm-*T.timopheevi*) exists in two differently expressed forms. *Plant Sci.* 66:237-246
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanchis V., Agaisse H., Chaufaux J., Lereclus D. (1997). A recombinase-mediated system for elimination of antibiotic resistance gene markers from genetically engineered *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol* 63 (2):779-84
- Sano K., Shiio I. (1970). Microbial production of lysine. Produktion by mutants resistant to S-aminoethylcysteine. *J Gen Appl Microbiol* 16:373-391
- Sarrobot T., Thibaud M.C., Contard-David P., Gineste S., Bechthold N., Robaglia C., Nussaume L. (2000). Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating threonine resulting from mutation in a new dihydrodipicolinate synthase gene. *Plant J* 24 (3):357-67
- Sato N., Albrieux C., Joyard J., Douce R., Kuoïwa T. (1993). Detection and characterisation of a plastid envelope DNA-binding protein which may anchor plastid nucleoids. *EMBO J* 12:555-561
- Sauter H., Ammermann E., Benoit R., Brand S., Gold R.E., Grammenos W., Köhle H., Lorenz G., Müller B., Röhl F., Schirmer U., Speakman J.B., Wenderoth B., Wingert H. (1995). Mitochondrial respiration as a target for antifungals: lessons from research on strobilurins. *Antifungal Agents-discovery and mode of action*; Dixon D.K., Copping L.G., Hollomon D.W. (eds), BIOS Scientific Publishers, Oxford pp 173-191
- Sauter H., Steglich W., Anke T. (1999). Strobilurins: evolution of a new class of active substances. *Angew Chem Int Ed* 38:1328-1349
- Schimper A.F.W. (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyll Körner und Farbkörner. *Bot Zeit* 41:105-114

Schopfer P., Brennicke A. (1999). Pflanzenphysiologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Schuster W., Brennicke A. (1987). Plastid, nuclear and reverse transcriptase sequences in the mitochondrial genome of *Oenothera*: is genetic information transferred between organelles via RNA ? EMBO J. 6 (10):2857-2863

Schuster W. (1993). Ribosomal protein gene rpl5 is cotranscribed with the nad3 gene in *Oenothera* mitochondria. Mol Gen Genet 240 (3):445-9

Schuster W., Brennicke A. (1994). The plant mitochondrial genome: physical structure, information content, RNA editing, and gene migration to the nucleus. Annu Rev Physiol Plant Mol Biol 45:61-78

Seymour R.S., Schultze-Motel P. (1999). Respiration, temperature regulation and energetics of thermogenic inflorescences of the dragon lily *Dracunculus vulgaris* (Araceae). Proc R Soc Lond B 266:1975-1983

Shadel G.S., Clayton D.A. (1993). Mitochondrial transcription initiation. Variation and conservation. J Biol Chem 268 (22):16083-6

Shah D.M., Horsch R.B., Klee H.J., Kishore G.M., Winter J.A., Turner N.E., Hironaka C.M., Sanders P.R., Gasser C.S., Aykent S., Siegel N.R., Rogeers S.G., Fraley R.T. (1986). Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science 233:478-481

Shalev G., Sitrit Y., Avivi-Ragolski N., Lichtenstein C., Levy A.A. (1999). Stimulation of homologous recombination in plants by expression of the bacterial resolvase ruvC. Proc Natl Acad Sci USA 96 (13):7398-402

Shaul O., Galili G. (1992a). Threonine Overproduktion in Transgenic Tobacco Plants Expressing a Mutant Desentized Aspartate Kinase of Escherichia coli. Plant Physiol 100:1157-1163

Shaul O., Galili G. (1992b). Increased lysine synthesis in tobacco plants that express high levels of bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. Plant J 2:203-209

Shaver J.M., Bittel D.C., Sellner J.M., Frisch D.A., Somers D.A., Gengenbach B.G. (1995). Single-amino acid substitutions eliminate lysine inhibition of maize dihydrodipicolinate synthase. Proc Natl Acad Sci USA 93 (5):1962-6

Shikanai T., Endo T., Hashimoto T., Yamada Y., Assada K., Yokota A. (1998). Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (16):9705-9

Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Yamaguchi-Shinozaki K., Ohto C., Torazawa K., Meng B.Y., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kato A., Tohdoh N., Shimada, H. and Sugiura M. (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *Plant Mol Biol Rep* 4:111-147

Sichertz-Pontén T., Kurland C.G., Andersson S.G.E. (1998). A phylogenetic analysis of the cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes supports an origin of mitochondria from within the *Rickettsiaceae*. *Biochim Biophys Acta*. 20; 1365(3):545-551

Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.Z., Hajdukiewicz P.T., Staub J.M., Nehra N.S. (1999). Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* 19 (2):209-216

Sikdar S.R., Serino G., Chaudhuri S., Maliga P. (1998). Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 18:20-20

Sitte P. (1993). Symbiogenetic evolution of complex cells and complex plastids. *European Journal of Protistology* 29:131-143

Skarjinskaia M., Svab Z., Maliga P. (2003). Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicacea. *Transgenic Res* 12 (1):115-22

Slater S., Mitsky T.A., Moumiel K.L., Hao M., Reiser S.E., Taylor N.B., Tran N., Valentin H.E., Rodriguez H.J., Stone D.A., Padgett S.R., Kishore G., Gruys K.J. (1999). Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production. *Nat Biotechnol* 17 (10):1011-6

Sluse F.E., Jarmuszkiewicz W. (1998). Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Braz J Med Biol Res* 31(6):733-47

Sluse F.E., Almeida A.M., Jarmuszkiewicz W., Vercesi A.E. (1998). Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. *FEBS Lett* 433 (3):237-40

Stanier R.Y. (1970). Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance. In: *Organization and control in prokaryotic and eukaryotic cells*, H.P. Charles and C.J.G. Knight (eds), Cambridge University Press, Cambridge, pp 1-38

Staub J.M., Maliga P. (1992). Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *Plant Cell* 4:39-45

Staub J.M., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz P.T., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J.A., Spatola L., Ward D., Ye G., Russell D.A. (2000). High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* 18 (3):333-338

Sternberg N., Hamilton D., Hoess R. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between *loxP* and the bacterial chromosome. *J Mol Biol* 150 (4):487-507

Sugita M., Sugiura M. (1996). Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol Biol* 32:315-326

Sugiura M. (1987). Structure and function of the tobacco chloroplast genome. *Bot Mag Tokyo* 100:407-436

Susuki T., Kawano S., Sakai A., Hirai A., Kuroiwa T. (1996). Variability of mitochondrial subgenomic molecules in the meristematic cells of higher plants. *Genes Genet Syst* 71 (5):329-33

Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8526-8530

Svab Z., Maliga P. (1993). High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:913-917

Svensson A.S., Rasmusson A.G. (2001). Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves. *Plant J* 28 (1):73-82

- Tang G., Zhu-Shimoni J.X., Amir R., Zchori I. BT., Galili G. (1997). Cloning and expression of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a monofunctional aspartate kinase homologous to the lysine-sensitive enzyme of *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol* 34 (2):287-93
- Tokito M.K. und Daldal F. (1993). Roles in inhibitor recognition and quinol oxidation of the amino acid side chains at positions of cyt b providing resistance to Q<sub>0</sub>-inhibitors of the bc<sub>1</sub> complex from *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol.* 9(5):965-78
- Tracy R.L., Stern D.B. (1995). Mitochondrial transcription initiation: promoter structures and RNA polymerases. *Curr Genet* 28 (3):205-16
- Tron T., Lemesle-Meunier D. (1990). Two substitutions at the same position in the mitochondrial cytochrome b gene of *S. cerevisiae* induce a mitochondrial myxothiazol resistance and impair the respiratory growth of the mutated strains albeit maintaining a good electron transfer activity. *Curr Genet* 18 (5):413-9
- Unseld M., Marienfeld J.R., Brandt P., Brennicke A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet* 15 (1):57-61
- Van den Hoek C., Jahns H.M. and Mann D.G. (1993). *Algen*. 3te Edition Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Van de Peer Y., Rensing S.A., Maier U.G., De Wachter R. (1996). Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies chlorarachniophyte endosymbionts as remnants of green algae. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7732-6
- Viale A.M. und Arakaki A.K. (1994). The chaperone connection to the origins of the eukaryotic organelles. *FEBS Lett* 341:146-51
- Vogel G. (1997). Searching for living relics of the cell 's early days. *Science* 277, 1604
- Vauterin M., Frankard V., Jacobs M. (1999). The *Arabidopsis thaliana* dhds gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner. *Plant Mol Biol* 39 (4):695-708
- Vauterin M., Frankard V., Jacobs M. (2000). Functional rescue of a bacterial dapA auxotroph with a plant cDNA library selects for mutant clones encoding a feedback-insensitive dihydrodipicolinate synthase. *Plant J* 21 (3):239-48

- Wahleithner J.A., Wolstenholme D.R. (1988). Origin and direction of replication in mitochondrial plasmid DNAs of broad bean, *Vicia faba*. *Curr Genet* 14 (2):163-70
- Wakasugi T., Tsudzuki J., Ito S., Nakashima K., Tsudzuki T., Sugiura M. (1994). Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (21):9794-8
- Wallin I.E. (1922). On the nature of mitochondria. *Am J Anat* 30:203-229, 451-471
- Ward B.L., Anderson R.S., Bendich A.J. (1981). The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (*Curcubitaceae*). *Cell* 25:793-803
- Weber S., Wolf K. (1988). Two changes of the same nucleotide confer resistance to diuron and antimycin in the mitochondrial cytochrome *b* gen of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* 237:31-34
- Weber W., Anke T., Bross M., Steglich W. (1990). Strobilurin D and strobilurin F: two new cytostatic and antifungal (E)-beta-methoxyacrylate antibiotics from *Cyphellopsis anomala* (1). *Planta Med* 56 (5):446-50
- Weeks K.M., Cech T.R. (1996). Assembly of a ribonucleoprotein catalyst by tertiary structure capture. *Science* 271 (5247):345-8
- Weihe A., Hedtke T., Börner T. (1997). Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *Nucleic Acids Res* 25 (12):2319-25
- Westhoff P., Herrmann R.G. (1988). Complex RNA maturation in chloroplasts: the *psbB* operon from spinach. *Eur J Biochem* 171:551-564
- Whitney S.M., Andrews T.J. (2001). Plastome-encoded bacterial ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) supports photosynthesis and growth in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (25):14738-14743
- Whittacker S.L., Assinder S.J., Shaw D.S. (1996). Inheritance of streptomycin and chloramphenicol resistance in *Phytophthora infestans*: evidence for co-segregation of mitochondrial DNA and streptomycin resistance. *Mycol Res* 100 (1):87-92

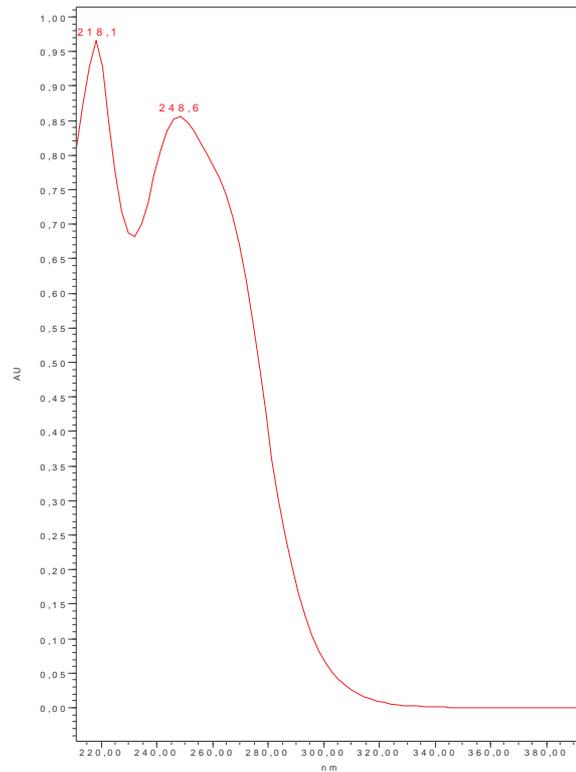
- Wissinger B., Hiesel R., Schuster W., Brennicke A. (1988). The NADH-dehydrogenase subunit 5 gene in *Oenothera* mitochondria contains two introns and is co-transcribed with the 5 S rRNA gene. *Mol Gen Genet* 212 (1):56-65
- Wissinger B., Schuster W., Brennicke A. (1990). Species-specific RNA editing patterns in the mitochondrial rps13 transcripts of *Oenothera* and *Daucus*. *Mol Gen Genet* 224 (3):389-95
- Wright G.D., Thompson P.R. (1999). Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci* 4:D 9-21
- Yamada Y., Kumpaisal R., Hashimoto T., Sugimoto Y., Susuki A. (1986). Growth and aspartate kinase activity in wheat cell suspension culture-effects of lysine analogs and aspartate derived amino acids. *Plant Cell Physiol* 27:607-610
- Yang D., Oyaizu Y., Oyaizus H., Olsen G.J., Woese C.R. (1985). Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4443-47
- Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 33 (1):103-19
- Ye F., Bernhardt J., Abel W.O. (1993). Genes for ribosomal proteins S3, L16, L5 and S14 are clustered in the mitochondrial genome of *Brassica napus L.* *Curr Genet* 24 (4):323-329
- Ye G.N., Hajdukiewicz P.T., Broyles D., Rodriguez D., Xu C.W., Nehra N., Staub J.M. (2001). Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *Plant J* 25 (3):261-270
- Zerges W. (2000). Translation in chloroplasts. *Biochimie* 82 (6-7):583-601
- Zhu X., Tang G., Granier F., Bouchez D., Galili G. (2001). A T-DNA insertion knockout of the bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase gene elevates lysine levels in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol* 126 (4):1539-45
- Zhu X., Tang G., Galili G. (2002). The activity of the *Arabidopsis* bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase enzyme of lysine catabolism is regulated by functional interaction between its two enzyme domains. *J Biol Chem* 277 (51):49655-61

Zhu X., Galili G. (2003). Increased lysine synthesis coupled with a knockout of its catabolism synergistically boosts lysine content and also transregulates the metabolism of other amino acids in Arabidopsis seeds. *Plant Cell* 15 (4):845-53

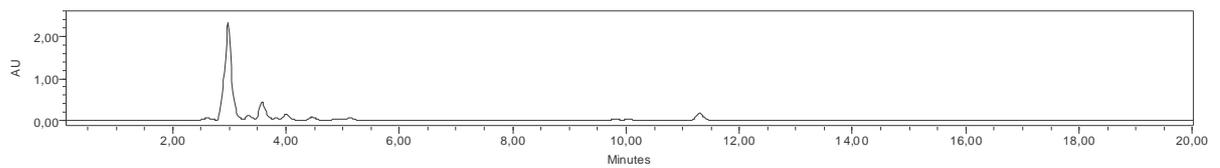
Zoubenko O.V., Allison L.A., Svab Z., Maliga P. (1994). Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. *Nucl Acids Res* 22:3819-24

## Lysingehaltsbestimmung in Tabaktransformanten

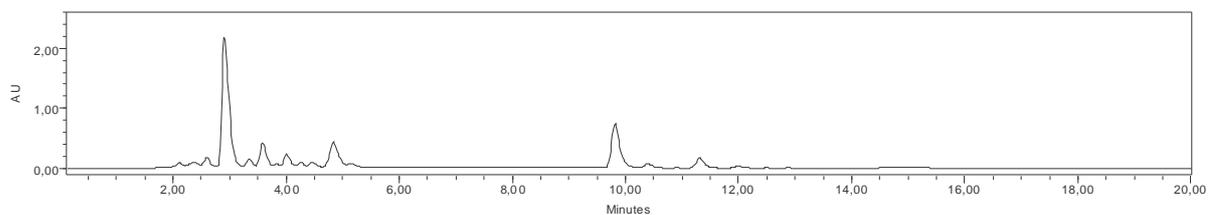
Spektrum von PTC-Lysin über den Bereich von 210 – 395 nm:



Chromatogramm *N. tabacum*-Wildtyp (PTC-Lysinpeak bei 9,8 Minuten):



Chromatogramm *N. tabacum* Transformante B3 (PTC-Lysinpeak bei 9,8 Minuten):



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Modell der Atmungskette in pflanzlichen Mitochondrien	7
Abb. 1.2	Strategien zur Mitochondrientransformation	21
Abb. 1.3	Resistenzverleihende Mutationen innerhalb des <i>cob</i> -Gens	24
Abb. 1.4	Der pflanzliche Aspartat-Stoffwechsel	26
Abb. 2.1	Klonierungsstrategie mitochondrienspezifischer Transformations- Kassetten	41
Abb. 2.2	Mitochondrienspezifische Transformationskassetten	44
Abb. 2.3	Aufbau der mitochondrialen Transformationskassetten mit einem resistenzverleihenden Markergen	45
Abb. 2.4	Modifikation des Transformationsvektors pBM <i>hph</i> II	46
Abb. 2.5	Klonierungsstrategie der plastidären Transformationskassetten	47
Abb. 2.6	Eichkurve zur Bestimmung des Lysingehaltes	57
Abb. 2.7	Dichtegradienten-Zentrifugation von Tabak-Protoplasten	62
Abb. 2.8	Dichtegradienten-Zentrifugation von <i>rpo</i> -Tabak-Protoplasten	63
Abb. 3.1	Wirkung von Chloramphenicol und Hygromycin auf das Wachstum von Tabakblattstücken	75
Abb. 3.2	Wirkung von Moa-Stilben auf das Wachstum von Tabakblattstücken	81
Abb. 3.3	Wirkung von Myxothiazol und Moa-Stilben auf die Regeneration von Tabakprotoplasten	84
Abb. 3.4	Regeneration von Tabakprotoplasten unter Einfluss von Myxothiazol und n-Propyl-Gallat	86
Abb. 3.5	Regeneration von <i>rpo</i> -Suspensionkulturen unter Einfluss von Myxothiazol, Antimycin und Moa-Stilben	90
Abb. 3.6	Regeneration von <i>rpo</i> -Suspensionkulturen unter dem Einfluss von nPG sowie Antimycin und nPG	91
Abb. 3.7	Regeneration von Arabidopsis-Suspensionkulturen unter Einfluss von Myxothiazol, Antimycin und Myxothiazol und nPG	92
Abb. 3.8	Analyse der mit der Transformationskassette pBM <i>hph</i> II transformierten Blattstücke und Protoplasten	97
Abb. 3.9	„Long-PCR“ und Southern-Analysen von potentiellen mitochondrialen pBM <i>hph</i> II-Transformanten	99

Abb. 3.10	Southern-Analysen potentieller mitochondrialer pBM <i>hph</i> II-Transformanten	103
Abb. 3.11	Analyse der mit der Transformationskassette pBM <i>hph</i> III und pBM <i>hph</i> IV transformierten Blattstücke	105
Abb. 3.12	Transformation von Arabidopsis-Suspensionskultur mit der Transformationskassette pUM <i>arg</i> II	106
Abb. 3.13	Exemplarische Darstellung der Moa-Stilben-resistenten Transformante PGM <i>arg</i> 12	108
Abb. 3.14	Analyse Moa-Stilben-resistenter Klone	110
Abb. 3.15	Wirkung von AEC auf die Regenerationsfähigkeit von Tabak- und Kartoffelblattstücken	113
Abb. 3.16	Hemmwirkung von AEC auf die Regenerationsfähigkeit von Tabak-Protoplasten	115
Abb. 3.17	Vergleich zwischen Regenerationsmedien bei <i>Solanum tuberosum</i> L. var. Walli	116
Abb. 3.18	Plastidären DHDPS-Tabaktransformanten und Tabakwildtyp-Pflanze	118
Abb. 3.19	Analyse Spectinomycin-resistenter plastidärer DHDPS-Linien	120
Abb. 3.20	Lysingehalt transplastomer Tabakpflanzen	121
Abb. 3.21	Selektion AEC-resistenter Linien	124
Abb. 3.22	Analyse AEC-resistenter plastidärer DHDPS-Linien	126
Abb. 4.1	Vergleich von zwei mitochondrialen <i>orf/nad3</i> Genclustern	134
Abb. 4.2	Mitochondriale Promotorelemente	140
Abb. 4.3	Zyklischer Elektronentransport im Komplex III der Mitochondrien	143
Abb. 4.4	Struktur des mitochondrialen Hemmstoffs E- $\beta$ -Methoxyacrylat	146
Abb. 4.5	Isoenzyme der Aspartatkinase bei Pflanzen	154
Abb. 4.6	Mechanismen zur Erhöhung des Lysingehaltes bei Pflanzen	157
Abb. 4.7	Lysinkatabolismus bei Pflanzen	159
Abb. 4.8	Selektionsschema AEC	161

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Resistenzverleihende Aminosäureveränderungen innerhalb des <i>cob</i> -Gens	9
Tab. 2.1	Oligonukleotide zur Klonierung von PCR-Fragmenten	40
Tab. 2.2	Oligonukleotide zur Herstellung von Transformationsvektoren durch inverse PCR	43
Tab. 2.3	DNA-Sonden zur Charakterisierung der plastidären und mitochondrialen Integration	50
Tab. 2.4	Gradientenprogramm für die Aufreinigung von PTC-Lysin aus Tabaktransformanten	56
Tab. 2.5	Kulturmedien für Tabak	59
Tab. 2.6	Kartoffel-Kulturmedien und Suspensionsmedien für Arabidopsis und <i>rpo</i> -Tabak	61
Tab. 2.7	Austausch der Regenerationsmedien in Abhängigkeit der eingesetzten Hemmstoffe	70
Tab. 2.8	Testreihen pflanzlicher Gewebearten mit verschiedenen Hemmstoffen	71
Tab. 3.1	Regeneration von Tabakblattstücken unter dem Einfluss von Antimycin	77
Tab. 3.2	Regeneration von <i>rpo</i> -Tabakblattstücken unter dem Einfluss von Antimycin	78
Tab. 3.3	Regeneration von Tabakblattstücken unter dem Einfluss von Myxothiazol	79
Tab. 3.4	Regeneration von <i>rpo</i> -Tabakblattstücken unter dem Einfluss von Myxothiazol	79
Tab. 3.5	Wachstum von <i>rpo</i> -Suspensionkulturen unter dem Einfluss der Hemmstoffe Myxothiazol, Antimycin und Moa-Stilben	87
Tab. 3.6	Wachstum von Arabidopsis-Suspensionkulturen unter dem Einfluss der Hemmstoffe Myxothiazol und Antimycin	88
Tab. 3.7	Hemmstoffkonzentrationen zur Selektion von Mitochondrien-transformanten aus Suspensionskulturen	89
Tab. 3.8	Potentielle Mitochondrien-Transformanten	95
Tab. 3.9	Darstellung der selektierten plastidären Transformanten	117

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Holger Loos  
Geburtsdatum: 25.10.1966  
Geburtsort: Mülheim an der Ruhr  
Familienstand: verheiratet (1 Kind)

### Ausbildung

1973 - 1977 Robert-Koch-Schule Oberhausen  
1977 - 1983 Gesamtschule Osterfeld  
Abschluss: Fachoberschulreife  
1983 – 1986 Ausbildung zum Elektromaschinenmonteur  
bei der Firma Kraftwerk-Union in Mülheim  
an der Ruhr  
1988 – 1991 Kolleg Oberhausen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Bundeswehr/Zivildienst

1987 - 1988 Zivildienst  
Einsatz im Pflegedienst des Luise-  
Schroeder Seniorenheims

### Studium

1992 – 1998 Studium der Gartenbauwissenschaften an der Universität Hannover.  
Schwerpunkt: Genetik und Pflanzenzüchtung. Titel der Diplomarbeit:  
RNA-Analysen zur Charakterisierung der cytoplasmatischen  
männlichen Sterilität beim Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.)  
im Vergleich zu anderen Kulturpflanzenarten.  
1998 – 2002 Erarbeitung der experimentellen Daten zur vorliegenden Dissertation  
am Botanischen Institut der LMU-München bei Dr. hab. W. Kofer.  
Seit 2003 Erziehungszeit

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilian-Universität München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.U. Koop unter Betreuung von Dr. habil. W. Kofer.

Mein ganz besonderer Dank gilt Waltraud Kofer für die Möglichkeit zwei überaus spannende Themenkomplexe bearbeiten zu dürfen sowie für die freundschaftliche und kollegiale Atmosphäre während dieser Zeit.

Herrn Prof. Dittrich danke ich für Übernahme des Koreferates.

Ulrich Koop danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor den experimentellen Teil dieser Arbeit durchführen zu können und für seine Unterstützung während dieser Zeit.

Allen früheren und jetzigen Labormitgliedern danke ich für ihre Hilfsbereitschaft: Rita, Nora, Petra, Sasha, Stefan M., Zou, Linda, Lars, Lydia, Claudia, Andi, Elke und Sebastian. Es hat großen Spaß gemacht mit euch im Labor zu arbeiten. Ein spezieller Dank geht an die Hiwis Timo, Claudia und Claudia sowie Andreas für das stundenlange Ausharren an der Sterilbank.

Lisa danke ich besonders für die geduldige Kultivierung der Suspensionskulturen.

Stefan gilt mein besonderer Dank für die hervorragende Zusammenarbeit, die Beharrlichkeit bei langwierigen Analysen und für so manchen netten Abend.

Christian danke ich dafür, dass er bei der Klärung auftauchender molekularbiologischer Probleme immer Zeit gefunden hat – auch für das kritische lesen des Skripts - und dafür, dass er das mit Proviant gefüllte Sommerhaus für fachliche und weniger fachliche Gespräche zur Verfügung gestellt hat.

Ein besonderer Dank gilt Micha aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Brennike der Uni Ulm für die ersten Schritte bei der „inversen-PCR“ und die freundliche Aufnahme. Für die Bereitstellung von Arabidopsis-Suspensionskulturen sowie für die fachlichen Ratschläge von Stefan Binder, die meistens kurzfristig notwendig waren, gilt mein besonderer Dank.