Markerfreie

transplastome Tabakpflanzen

Dissertation

der Fakultät für Biologie der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Sebastian Klaus

06. Dezember 2002

1. Gutachter: **Prof. Dr. H.-U. Koop**

2. Gutachter: **PD Dr. R. Maier**

Tag der mündlichen Prüfung: **21. 02. 03**

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 1

Einleitung 3

1.1 Die Plastidentransformation in höheren Pflanzen 3
1.2 Visuelle Marker in der Pflanzentransformation 7
1.3 Deletion und Rekonstitution eines plastidären Gens 10
1.4 Markerfreie Plastidentransformanten 12

Material und Methoden 18

2.1 Biochemikalien, Enzyme 18
2.2 DNA, Organismen 19
2.3 Geräte, Verbrauchsmaterial, Software 20
2.4 Herstellung rekombinanter Plasmide 20
2.4.1 Allgemeine Methoden 20
2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA 20
2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 21
2.4.4 DNA-Sequenzierung 23
2.4.5 Klonierung der Transformationsvektoren 23
2.5 Chloroplasten-Transformation 26
2.5.1 *In vitro*-Kultur von Tabakpflanzen 26
2.5.2 ‚Particle gun'-Transformation von Tabak-Blättern 26
2.5.3 PEG-Transformation von Protoplasten 28
2.5.4 ‚Particle gun'-Transformation von Mikrokolonien 31
2.6 Selektion plastidärer Transformanten 31
2.6.1 Selektion mit Spektinomycin/Streptomycin 32
2.6.2 Selektion mit Kanamycin 32
2.6.3 Kanamycin-unterstützte Photosynthese-Selektion 33
2.6.4 Mixotrophe Selektionsbedingungen 33
2.7 Analyse potentieller Plastidentransformanten 33
2.7.1 Allgemeine Methoden 33
2.7.2 Isolierung von DNA aus Tabakpflanzen 34
2.7.3 PCR-Analyse 35
2.7.4 Southern-Analyse 35
2.7.5 Expressionsstudien des *aphA-6*-Gens 36
2.7.6 Expressionsnachweis des *uidA*-Gens 36
2.7.7 Detektion starker Chlorophyll-Fluoreszenz 37

Ergebnisse 38

3.1 Mikrokolonien als Zielgewebe für die Plastidentransformation 38
3.1.1 ‚Particle gun'-Beschuss von Mikrokolonien 38
3.1.2 Analyse Spektinomycin-resistenter Regenerate 41
3.2 Etablierung des *aphA-6*-Gens als plastidärer Marker 41
3.2.1 Klonierung von Vektoren mit dem *aphA-6*-Gen als Selektionsmarker 41
3.3.2 Bestimmung der Kanamycin-Selektionsbedingungen 42
3.2.3 Selektion Kanamycin-resistenter Regenerate 42
3.2.4 Analyse Kanamycin-resistenter Regenerate 45
3.2.5 Expression des *aphA-6*-Gens in Plastidentransformanten 46
3.2.6 Analyse der Nachkommen (T1) 46
3.3 Deletion und Rekonstitution eines plastidären Gens 47
3.3.1 Deletion des *petA*-Gens 47
3.3.2 Samenproduktion aus *petA*-defizienten Mutanten 50
3.3.3 Rekonstitution des *petA*-Gens 52
3.4 Integration des Transformationsvektors über eine Flanke 57
3.5 Herstellung Marker-freier Plastidentransformanten 61
3.5.1 Rekonstitution von Δ*petA*-Mutanten unter mixotrophen Selektionsbedingungen 61
3.5.2 Rekonstitution von Δ*petA*-Mutanten mit Hilfe einer kombinierten Kanamycin/Photosynthese-Selektion 64

Diskussion 69

4.1 Das *aphA-6*-Gen als neuer effizienter plastidärer Selektionsmarker in höheren Pflanzen 69
4.2 Deletion und Rekonstitution des plastidären *petA*-Gens 72
4.3 Neue Erkenntnisse über die Rekombination in Chloroplasten 76
4.4 Mixotrophe Bedingungen zur Selektion plastidärer Transformanten 78
4.5 Herstellung markerfreier Plastidentransformanten 80
4.5.1 Verbreitung von Transgenen 80
4.5.2 Markerfreie Chloroplasten-Transformanten 83

Literaturverzeichnis 88

Anhang 106

Abbildungsverzeichnis 106
Tabellenverzeichnis 106
Lebenslauf 107
Veröffentlichungen 107
Danksagung 108

Abkürzungen

16S	Promotor des plastidären 16S rRNA-Gens
A	Adenin
Amp^R	Ampicillin-Resistenz
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
CD	Cytosin-Deaminase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dNTP(s)	Desoxyribonukleintriphosphat(e)
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
G	Guanin
GFP	‚green fluorescent protein'
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde(n)
H_2O_{bd}	doppelt destilliertes Wasser
HCF	‚high chlorophyll fluorescence'
HGT	Horizontaler Gentransfer
IR_A, IR_B	‚inverted repeat A/B'
kb	Kilobasen
l	Liter
LB_{Amp}	Luria-Bertani Medium, angereichert mit Ampicillin (150 mg/l)
LSC	‚large single copy' region
M	Mol, molar bzw. DNA-Marker
MES	2-(N-Morpholino-)ethansulfonsäure
min	Minute(n)
mM	millimolar
mOsm	Milliosmol
mRNA	messenger RNA
µ	Mikro-
NAA	α-Naphthylessigsäure
ori	‚origin of replication', Replikationsursprung
ORF	‚open reading frame'
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	*potentia hydrogenii*, lat.
PP	Protoplasten
RBS	‚ribosomal binding site', Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Runden pro Minute (Zentrifugationsgeschwindigkeit)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde(n)
T	Thymin
T#	Transformationsnummer
TE	Tris-EDTA
V	Volt
WT	Wildtyp
w/v	‚weight/volume'
U	unit, enzymatische Aktivitätseinheit
UTR	‚untranslated region', nicht translatierte RNA-Bereiche
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronid
ycf	‚hypothetical chloroplast open reading frame'

Zusammenfassung

Die Chloroplasten-Transformation in höheren Pflanzen wird in der Regel unter Verwendung des dominanten Selektionsmarkers *aadA* erreicht. In dieser Arbeit konnte das *aphA-6*-Gen von *Acinetobacter baumannii* als neuer effizienter Selektionsmarker für die Plastidentransformation in Tabak etabliert werden. Dafür wurden chimäre *aphA-6*-Konstrukte mit Hilfe des ‚particle gun'-Beschusses von Mikrokolonien oder durch PEG-Behandlung von Protoplasten in Tabak-Chloroplasten eingebracht. Die gezielte Plastom-Insertion wurde durch homologe Rekombination erreicht, und plastidäre Transformanten aufgrund ihrer Resistenz gegenüber Kanamycin selektiert. Die Etablierung eines zweiten effizienten Chloroplasten-Markers neben dem bis heute fast ausschließlich verwendeten *aadA*-Gen ermöglichte es, die Deletion und die Rekonstitution des *petA*-Gens unter sukzessiver Verwendung zweier Marker, *aadA* und *aphA-6*, durchzuführen.

Ein visuelles Selektionssystem würde die Erkennung plastidärer Transformanten deutlich vereinfachen und einen Fortschritt auf dem Gebiet der Chloroplasten-Transformation in höheren Pflanzen bedeuten. Für die Entwicklung eines solchen phänotypischen Selektionssystems wurde die Rekonstitution einer Photosynthese-defizienten Plastidenmutante ausgewählt. Dabei wurden *petA*-deletierte Pflanzen anstelle von Wildtyp-Pflanzen als Ausgangsmaterial für die Chloroplasten-Transformation eingesetzt, wobei das *petA*-Gen re-integriert und das *aphA-6*-Gen als Selektionsmarker eingesetzt wurde. Die Rekonstitution des *petA*-Gens resultierte in transformierten Regeneraten, die sich durch einen deutlich sichtbaren Phänotyp auszeichneten, der vergleichbar mit dem des Wildtyps war. Dieses neuartige Transformations-/Selektionssystem überwindet das Problem des Auftretens „falsch-positiver" Transformanten (spontane Mutanten, Kerninsertionen), wie sie in der Chloroplasten-Transformation regelmäßig beschrieben werden. Zusätzlich zu den Vorteilen der phänotypischen Selektion treibt die Wiederinstandsetzung der photosynthetischen Energiegewinnung die *petA*-rekonstituierten Pflanzen sehr schnell zu einem homoplastomischen Zustand. Dies erübrigt wiederholte zeitaufwendige Regenerationszyklen unter Selektionsbedingungen.

Die Rekonstitution des *petA*-Gens konnte auch für die Herstellung markerfreier Plastidentransformanten verwendet werden. Um dies zu erreichen, wurden neu erworbene Erkenntnisse bezüglich des generellen Ablaufs der doppelt-reziproken Rekombination einbezogen. Die stabile Integration neuer DNA-Sequenzen in das plastidäre Genom

benötigt zwei homologe Flanken zur Rekombination. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung konventioneller Plastidentransformationsvektoren mit zwei Flanken für die gezielte Geninsertion der gesamte Transformationsvektor erst über eine Flanke ins Plastom integriert. Dem folgt in einem zweiten Rekombinationsschritt die stabile Integration neuer Gensequenzen. Die kurzzeitige Integration des gesamten Transformationsvektors konnte zur vorrübergehenden Expression des *aphA-6*-Gens verwendet werden, um in Rekonstitutionsexperimenten auf Kanamycin-resistente Regenerate zu selektieren. Da das *aphA-6*-Gen jedoch nicht stabil integriert und der Marker für die *petA*-Deletion, das *aadA*-Gen, durch die *petA*-Rekonstitution aus dem Plastom entfernt wurde, waren alle auf diese Weise hergestellten transplastomen Pflanzen markerfrei.

1 Einleitung

1.1 Die Plastidentransformation in höheren Pflanzen

Die genetische Veränderung von Pflanzen mittels Transformation hat ihren Ursprung in den 80er Jahren, als erstmals mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* Fremd-DNA stabil in den Zellkern integriert werden konnte (Barton und Chilton 1983, Barton et al. 1983, Tepfer 1984). *Agrobacterium tumefaciens* kann mit Hilfe des ‚Ti-Plasmid' DNA-Sequenzen in pflanzliche Zellen schleusen. Da diese Transformationsmethode aber nicht bei allen Pflanzenarten angewandt werden konnte, wurden weitere Methoden entwickelt, um auch andere Spezies der genetischen Veränderung zugänglich zu machen. Allerdings gehört das Verfahren unter Zuhilfenahme von *Agrobacterium tumefaciens* nach wie vor zu den wichtigsten Transformationsmethoden.

Die stabile genetische Veränderung des pflanzlichen Zellkerns kann auch durch Methoden wie Polyethylenglykol-Behandlung (PEG), Liposomen-Aufnahme, Elektroporation, Ultraschall-Behandlung, Mikroinjektion und ‚particle gun'-Beschuss erreicht werden (zusammengefasst in Davey et al. 1989, Potrykus 1990). Aufgrund der hohen Transformationseffizienz und relativ einfachen Durchführbarkeit ist die Methode des ‚particle gun'-Beschusses nach Klein und Sanford (Klein et al. 1987, Sanford et al. 1987) inzwischen weit verbreitet. Diese Technik beruht auf der durch Helium-Gas erzeugten Beschleunigung von DNA-beladenen Mikroprojektilen, die auf diese Weise in das zu transformierende Gewebe eindringen.

Bei den ersten Versuchen, das Genom der Chloroplasten gezielt zu verändern, kam anfangs auch die „*Agrobacterium*-Transformation" zum Einsatz. Die stabile Integration des Chloramphenicol-Acetyltransferasegens als Marker in das Tabakplastom konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, obwohl Chloramphenicol-resistente Linien gefunden worden waren (De Block et al. 1985). Auch spätere Versuche, mit Hilfe des ‚Ti-Plasmids' das Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*nptII*) unter Kontrolle des plastidären *psbA*-Promotors stabil ins Tabakplastom zu integrieren, waren nicht erfolgreich (Cornelissen et al. 1987). Die erste nachweislich stabile Chloroplasten-Transformation wurde mit Hilfe der ‚particle gun'-Methode bei der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* durchgeführt (Boynton et al. 1988). Dabei wurden photosynthetisch inaktive *atpB*-Defektmutanten mit Mikroprojektilen beschossen, die DNA-Konstrukte mit einer Wildtyp-Kopie des *atpB*-

Gens trugen. Die stabile Integration des *atpB*-Gens in das Chloroplastengenom befähigte transformierte Zellen zu autotrophem Wachstum und ermöglichte so die Identifizierung und Selektion transformierter Zellen.

Die Einführung fremder DNA in die Chloroplasten höherer Pflanzen wurde erstmals von Svab et al. (1990) erfolgreich durchgeführt. In mehreren Experimenten konnte die stabile Integration eines modifizierten 16S rDNA-Genfragments in das Chloroplastengenom der Modellpflanze *Nicotiana tabacum* (Tabak) nachgewiesen werden. Ein Meilenstein in der Plastidentransformation war die erfolgreiche Verwendung des Aminoglykosid-3'-Adenyltransferasegens als Selektionsmarker. Das aus *Escherichia coli* stammende *aadA*-Gen (Prentki und Krisch 1984) kam erstmals als Selektionsmarker für die Plastidentransformation von *Chlamydomonas reinhardtii* zum Einsatz und verlieh transplastomen Zellen Resistenz gegen das Aminoglykosid-Antibiotikum Spektinomycin (Goldschmidt-Clermont 1991). Der Entgiftungsmechanismus des *aadA*-Genprodukts beruht auf der Übertragung des Adenylrestes von ATP auf Spektinomycin bzw. Streptomycin (Adenylierung), was die inhibierende Bindung der Antibiotika an die 70S-Ribosomen verhindert. Dieses erfolgreiche Selektionssystem konnte auch auf die Plastidentransformation höherer Pflanzen übertragen werden, wobei die Transformationseffizienz im Vergleich zur Verwendung des modifizierten 16S rDNA-Genfragments deutlich höher war (Svab und Maliga 1993). Das *aadA*-Gen ist seitdem der einzige routinemäßig verwendete Plastidenselektionsmarker. Er eröffnete in der Grundlagenforschung und in angewandten Bereichen neue Wege in der Chloroplasten-Biologie. Das von Carrer et al. (1993) als Plastidenmarker erfolgreich eingesetzte Neomycin-Phosphotransferasegen (*nptII*) war (und ist) ein viel verwendeter Marker für die Kerntransformation verschiedener höherer Pflanzen (Bevan et al. 1983, Fraley et al. 1983, Zhang et al. 1988). Die Ineffizienz des *nptII*-Gens als Marker in der Chloroplasten-Transformation erklärt jedoch, warum bis heute keine weiteren Anwendungen veröffentlicht wurden.

Das *aadA*-Gen wurde in Kombination mit der biolistischen Methode auch in der Plastidentransformation anderer höherer Pflanzenarten als Selektionsmarker eingesetzt. Die erfolgreiche Insertion einer *aadA*-Expressionskassette in das Chloroplastengenom wurde in Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*, Sikdar et al. 1998), Kartoffel (*Solanum tuberosum*, Sidorov et al. 1999), Reis (*Oryza sativa*, Khan and Maliga 1999) und Tomate (*Lycopersicon esculentum*, Ruf et al. 2001) beschrieben. In all diesen Fällen war jedoch die Transformationseffizienz im Vergleich zu Tabak sehr gering. Zudem konnten von

transplastomen *Arabidopsis*-Linien keine fertilen Pflanzen herangezogen werden. Auch die Selektion homoplastomischer Tomatenlinien stellte sich als sehr langwierig heraus, ein Prozess, der vom ‚particle gun'-Beschuss bis zur reifen transplastomen Tomatenfrucht fast zwei Jahre dauerte.

Neben der Plastidentransformation mit Hilfe der ‚particle gun' wurde eine weitere Methode etabliert, die in der Kerntransformation standardmäßig eingesetzt wird: die Verwendung von Polyethylenglykol (PEG) zur Transformation von Tabakchloroplasten (Golds et al. 1993, O'Neill et al. 1993). Bei dieser technisch weit weniger aufwendigen Alternative werden Tabakprotoplasten mit DNA und PEG inkubiert und anschließend zur Regeneration in Plastiknetze eingebettet (Koop et al. 1996, Kofer et al. 1998b). Wie die DNA hierbei in die Plastiden gelangt, ist unbekannt. Es wird jedoch spekuliert, dass durch die PEG-Einwirkung Löcher in der Zellmembran und den direkt anliegenden Chloroplasten entstehen, durch die DNA aufgenommen werden kann. Die Entwicklung neuer Transformationsmethoden und die Verwendung anderer Zielgewebe wie z.B. Kallusgewebe könnten bestehende Transformationseffizienzen verbessern und zusätzliche Möglichkeiten in der Plastidentransformation neuer Pflanzenarten eröffnen.

Kürzlich wurde der erste Plastidenmarker beschrieben, der nicht auf einem Resistenzmechanismus gegen Antibiotika beruht: Die Umwandlung des für Pflanzen toxischen Betainaldehyds in Cholin durch die Betainaldehyd-Dehydrogenase (BADH) wurde von Daniell et al. (2001a) als Selektionskriterium für die Plastidentransformation von Tabak beschrieben. Die Transformationseffizienz mit dem aus Spinat (*Spinacia oleracea*) stammenden *badh*-Gen als Plastidenmarker soll verglichen mit dem *aadA*-Gen 25-fach höher sein. Zudem wird als weiterer Vorteil die schnelle Regeneration von Transformanten in nur 12 Tagen beschrieben. Da die in dieser Veröffentlichung beschriebenen Ergebnisse jedoch teilweise schwer nachvollziehbar sind und die Kosten des Betainaldehyds immens hoch sind, wird die Zukunft zeigen müssen, welche Rolle das *badh*-Gen als Chloroplastenmarker spielen wird.

Die Plastidentransformation eröffnete neben der weit verbreiteten Kerntransformation die Möglichkeit, ein weiteres Genom der pflanzlichen Zelle für die Grundlagenforschung und angewandte Bereiche der Biotechnologie verfügbar zu machen. So konnte auf der einen Seite die Charakterisierung offener Leserahmen (‚open reading frame', ORF) und die Funktionsanalyse plastidärer Gene wie die der *ndh*-Gruppe (Burrows 1998, Kofer et al. 1998a, Shikanai et al. 1998) oder der *rpo*-Gruppe (Allison et al. 1996, De Santis-

Maciossek et al. 1999, Krause et al. 2000) erreicht werden. Auf der anderen Seite wurden auch im angewandten Bereich Erfolge erzielt, wie die Expression des *Bt* (*Bacillus thuringiensis*)-Toxins (McBride et al. 1995, De Cosa et al. 2001), des Cholera-Toxins (Daniell et al. 2001b), eines antimikrobiellen Peptids (DeGray et al. 2001) und von Herbizid-Resistenz erzeugenden Proteinen wie EPSP (Daniell et al. 1998, Ye et al. 2001) und PAT (Iamtham und Day 2000, Lutz et al. 2001). Zudem wurden auch Human-Proteine wie Somatotropin (Staub et al. 2000), Insulin und Interferon (Daniell et al. 2002a) sowie biologisch abbaubare Polymere (Guba et al. 2000, Nakashita et al. 2001, Lössl et al. 2002) in transgenen Chloroplasten produziert.

Die Integration neuer Gene in das plastidäre Genom birgt eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Kerntransformation: (i) punktgenaue Integration (ii) polycistronische Genexpression, (iii) höhere Gesamtexpression, (iv) Protein-Akkumulierung, (v) maternale Vererbung, (vi) Fehlen von unvorhersehbaren „Positionseffekten“ und (vii) Fehlen von Inaktivaktivierung durch ‚gene silencing’.

Die exakte Integration neuer DNA-Sequenzen in das Plastiden-Genom erfolgt durch doppelt-reziproke Rekombination. Zu inserierende Gene werden zwischen zwei Plastom-identische Sequenzen, den sogenannten Flanken, in den Transformationsvektor eingefügt und mittels homologer Rekombination in das plastidäre Genom integriert (Maliga et al. 1994). Auf diesem Weg ist es möglich, neue Gene neutral in Zwischengenbereiche zu integrieren oder plastidäre Gene spezifisch zu deletieren. Des weiteren ist es im Plastom (im Gegensatz zum Kerngenom) möglich, viele hintereinandergeschaltete Gene (‚polycistronisch’) unter der Kontrolle eines einzigen Promotors exprimieren zu lassen. Die polycistronische Genanordnung erlaubt es, eine Reihe von Fremd-Genen gleichzeitig zu exprimieren und erleichtert auf diese Weise die Durchführung mehrstufiger enzymatischer Prozesse in den Chloroplasten. Bei dem Vergleich von Kern- und Plastidentransformation sticht vor allem auch der Faktor ‘Genkopien pro Zelle’ heraus. Die Anzahl an Chloroplasten in einer vollentwickelten Blattzelle wird mit 50-100, die Anzahl von Plastiden-Genomen pro Chloroplast ebenfalls mit 50-100 angegeben, was eine Gesamtanzahl von 2.500-10.000 Plastommolekülen pro Zelle ergibt (Bendich 1987, Bogorad 2000). Diese Hochrechnung zeigt den immensen Vorteil der Integration von neuen Genen in das plastidäre Genom: die hohe Anzahl von Transgenen in Plastidentransformanten steht in direktem Kontrast zur Kerntransformation, wo selbst in hochgezüchteten Pflanzenarten nur zwischen 2 und maximal 6 Genkopien pro Zelle vorliegen. Entsprechend kann die Protein-Expression in Blättern transplastomer Pflanzen

signifikant höher sein als bei Kerntransformanten (Bock und Hagemann 2000, Bogorad 2000, Heifetz 2000, Daniell et al. 2002a, Maliga 2002). Die physiologische Umgebung in Chloroplasten kann zudem sowohl für enzymatische Prozesse und Proteinstabilität als auch für die Akkumulierung rekombinanter Proteine von Vorteil sein. Zudem können energieaufwendige biochemische Prozesse in direkter Nachbarschaft zur pflanzlichen Energiegewinnung, der Photosynthese, ablaufen. Um die Kreuzung von transgenen Linien mit Wildtyplinien oder verwandten Arten zu vermeiden, ist es ebenfalls von Bedeutung, Strategien zu entwickeln, mit deren Hilfe die Verbreitung kontrolliert bzw. unterbunden werden kann. Daher ist ein wichtiger Aspekt in der Verwendung transgener Pflanzen das Problem der Verbreitung des Transgens über den Pollen. Kerntransformanten verbreiten ihre neu integrierten Gene auch über den Pollen, wohingegen die meisten Pflanzen eine maternale Vererbung der cytoplasmatischen Erbträger aufweisen und daher plastidäre DNA in diesen Fällen nur über die weiblichen Gameten vererbt wird.

1.2 Visuelle Marker in der Pflanzentransformation

Die Verwendung eines ausschließlich visuell selektierbaren Markers war auf dem Gebiet der Pflanzentransformation schon immer von großem Interesse, da ein optisches *in vivo*-Selektionssystem anstelle von Resistenzgenen eingesetzt werden könnte und so die Selektion transgener Transformanten erleichtern würde. Ein Beispiel für einen optischen Selektionsmarker, dessen Expression *in vivo* sichtbar gemacht werden kann, ohne dass die Pflanzenzellen dazu abgetötet werden müssen (‚non-destructive reporter'), ist die Luziferase. Dieses Enzym stammt aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) und wurde zur Expression in verschiedenste mono- und dikotyle Pflanzenarten erfolgreich transformiert (Ow et al. 1986, Schneider 1987, Fromm et al. 1990, Millar et al. 1992a). Die Lichterzeugung der Luziferase beruht auf der Adenosintriphosphat-(ATP)-abhängigen Oxidation des Luziferins, welches von pflanzlichen Zellen direkt aufgenommen werden kann. Die erste direkte optische Selektion von Transformanten unter Verwendung der Luziferase gestaltete sich anfangs schwierig, da das emittierte Licht erst nach mehrstündiger Belichtung eines Films detektierbar war (Ow et al. 1986). Später konnte mit Hilfe einer gekühlten CCD-(Charge Coupled Device)-Kamera die durch die Luziferin-Oxidation entstandene Lumineszenz in transgenem pflanzlichen Gewebe direkt detektiert

werden (Millar et al. 1992b, Kay et al. 1994, Xiong et al. 1999). Neben der Glühwürmchen-Luziferase wurde auch die Luziferase der Weichkoralle *Renilla reniformis* in transgenen Pflanzen zur Expressionsanalyse verwendet (Mayerhofer et al. 1995, Frey et al. 2001).

Ein weiterer ‚non-destructive reporter' ist das aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* stammende ‚green fluorescent protein' (GFP), ein durch Anregung mit Blau- oder UV-Licht grün fluoreszierendes Protein. Das GFP kam in der Kerntransformation verschiedener mono- und dikotyler Pflanzenarten zur visuell-unterstützten Selektion zum Einsatz (Chalfie et al. 1994, Pang et al. 1996, Vain et al. 1998, Quaedvlieg et al. 1998, Ponappa et al. 1999, Lawton et al. 2000, Mankin und Thompson 2001). Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Varianten von grün-fluoreszierenden Proteinen als optische Marker eingesetzt, wobei es nur in Ausnahmefällen möglich war, transformierte Regenerate anhand ihrer Fluoreszenz direkt mit dem Auge zu erkennen (Pang et al. 1996).

Neben den beschriebenen *in vivo*-Selektionsmarkern wird häufig auch der ‚destructive reporter' β-Glucuronidase (GUS) als optischer Marker in der Kerntransformation verschiedener höherer Pflanzen eingesetzt (Jefferson et al. 1987, Fromm et al. 1990, Meijer et al. 1991, Shen et al. 1993, Becker et al. 1994, Sawahel 2001). Die Expression des GUS-Proteins kann jedoch nur durch invasive Maßnahmen nachgewiesen werden. Dabei werden die Pflanzenzellen durch die Aufnahme des giftigen Farbstoffes X-Gluc (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronid) und nachfolgende Chlorophyll-Extraktion mit Ethanol abgetötet oder bei der Herstellung eines Enzym-Rohextrakts zerstört.

Als erster optischer Marker in der Plastidentransformation wurde das GUS-Protein in *Chlamydomonas reinhardtii* integriert und exprimiert (Blowers et al. 1990, Klein et al. 1992), bevor die stabile Integration des *uidA*-Gens ins plastidäre Genom auch bei höheren Pflanzen erfolgreich durchgeführt wurde (Staub und Maliga 1993, Staub und Maliga 1995a). In vielen Fällen wurde die β-Glucuronidase in Expressionsstudien eingesetzt, bei denen die Menge an transkribierten bzw. translatierten *uidA*-Gen in Abhängigkeit der jeweiligen plastidären Regelelemente getestet wurde (Staub und Maliga 1993, Staub und Maliga 1994b, Eibl et al. 1999, Monde et al. 2000c).

Das ‚green fluorescent protein' konnte erstmals als visueller Marker in die subzellulären Kompartimente höherer Pflanzen, die Mitochondrien und Chloroplasten, importiert werden (Köhler et al. 1997a, Köhler et al. 1997b). Dabei wurde das Kern-kodierte GFP mit Hilfe

spezifischer Zielsequenzen in die Organellen pflanzlicher Zellen eingeführt, wo die typische grüne Fluoreszenz detektiert werden konnte. Auch durch den Import eines rot-fluoreszierenden Proteins der Blaupunktscheibenanemone *Discosoma sp.* gelang die Visualisierung von Tabak-Chloroplasten (Jach et al. 2001).

Neben dem anfänglichen Import des ‚green fluorescent protein' in Chloroplasten wurde das *gfp*-Gen auch als transienter Plastidenmarker in höheren Pflanzen eingesetzt (Hibberd et al. 1998). Dem folgte wenig später die erste stabile Integration des GFP ins plastidäre Genom von Tabak und Reis, wobei hier das Fusionsprotein ‚FLARE-S' (*aadA-gfp*) verwendet wurde (Khan und Maliga 1999). Transformierte Zellen konnten jedoch nicht anhand ihrer grünen Fluoreszenz selektiert werden, sondern aufgrund der durch das *aadA*-Genprodukt verliehenen Spektinomycin-Resistenz. Auch bei der ersten Plastiden-transformation von Kartoffel konnte die grüne GFP-Fluoreszenz neben dem eigentlichen Selektionsmarker *aadA* nicht direkt zur visuellen Selektion eingesetzt werden (Sidorov et al. 1999). Auch unter Verwendung eines GFP-Proteins mit veränderten Fluoreszenz-eigenschaften (‚red fluorescent protein') war es trotz eines erreichten Expressionsniveaus von 5 % an gesamt löslichem Protein nicht möglich, transplastome Tabakzellen optisch zu selektieren (Reed et al. 2001).

Auch die Luziferase der Weichkoralle *Renilla reniformis* wurde als visueller Marker in transgenen Chloroplasten der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* exprimiert (Minko et al. 1999). Alle transplastomen Linien zeigten in Anwesenheit des Substrats Coelenterazin eine starke Lumineszenz, die eine Differenzierung zwischen transformierten und nicht transformierten Zellen mit Hilfe einer gekühlten CCD-Kamera ermöglichte. Bis heute gibt es jedoch keine Veröffentlichungen, die eine Verwendung der Luziferase in der Plastidentransformation höherer Pflanzen beschreiben.

Die Entwicklung neuer visueller Marker in der Chloroplasten-Transformation könnte die Selektion transplastomer Regenerate nicht nur erleichtern. Ein Selektionssystem, das ausschließlich auf der optischen Erkennung von Transformanten beruht, würde zudem Antibiotika-Resistenzgene überflüssig machen. Des weiteren könnte ein optisches Selektionssystem auch Probleme derzeit verfügbarer Markergene beheben, bei denen regelmäßig „falsch-positive" Linien auftreten. Zufällige Punktmutationen in plastidären Genen können zu Resistenzen gegenüber den Antibiotika Spektinomycin, Streptomycin, Kanamycin führen, wie bei *Chlamydomonas reinhardtii* erstmals gezeigt werden konnte (Harris et al. 1989). Auch beim Schwarzen Nachtschatten (*Solanum nigrum*) konnte nachgewiesen werden, dass Punktmutationen in verschiedenen plastidären Genen zu

Resistenz gegenüber Spektinomycin, Streptomycin und Linkomycin führen (Kavanagh et al. 1994). Das Auftreten spontaner Spektinomycin-resistenter Regenerate bleibt auch bei der Verwendung des *aadA*-Gens als Selektionsmarker in der Plastidentransformation höherer Pflanzen ein Problem. In allen Publikationen zum Einsatz des *aadA*-Gens als plastidärer Marker in Tabak und anderen höheren Pflanzenarten wie *Arabidopsis*, Kartoffel und Tomate wurde das Auftreten „falsch-positiver" Regenerate beschrieben (Svab und Maliga, 1993, Sikdar et al., 1998, Sidorov, 1999, Ruf et al., 2001). Die Verwendung einer Doppelselektion mit Spektinomycin und Streptomycin löst zwar dieses Problem (Koop et al. 1996, De Santis-Maciossek et al. 1999, Kavanagh et al. 1999). Auf der anderen Seite hat Streptomycin eine stark einschränkende Wirkung auf die Zellregeneration und soll zudem mutagen sein (Sager 1962).

Des weiteren können „falsch-positive" Chloroplasten-Transformanten auch durch die Integration des Antibiotikum-Resistenzgens in den Kern auftreten, wo eine zufällige Insertion hinter einen aktiven Promotor zu Expression und Resistenz führt. Dieses Phänomen wurde vor allem bei der Verwendung des *nptII*-Gens beobachtet, wo nur 3 von insgesamt 99 Kanamycin-resistenten Regeneraten echte Plastidentransformanten waren. Alle anderen stellten sich als Kerntransformanten heraus (Carrer et al., 1993). Ein weiterer Nachteil dominanter Selektionsmarker ist die Tatsache, dass die Genexpression in einer Zelle zu einer lokalen Entgiftung in umgebenden Zellen führen kann. Dies könnte erklären, warum „falsch-positive" Chloroplasten-Transformanten bei Experimenten erhalten wurden, bei denen der nicht antibiotische Selektionsmarker *badh* verwendet wurde (Daniell et al. 2001a). Zusätzlich haben solche lokalen Entgiftungsmechanismen den unerwünschten Effekt, dass Plastiden längere Zeit in einem heteroplastomischen Zustand bleiben können (Dix und Kavanagh, 1995). Die meisten Arbeitsgruppen beschreiben die Notwendigkeit mehrerer *in vitro*-Regenerationszyklen, um transplastome Pflanzen homoplastomisch für das Transgen zu bekommen. Dieses „Zyklisieren" kann den Zeitraum der *in vitro*-Kultur beträchtlich ausdehnen und ist daher unerwünscht.

1.3 Deletion und Rekonstitution eines plastidären Gens

Die Erzeugung von Defektmutanten ist eine weit verbreitete Methode zur Charakterisierung unbekannter Gene und zur Funktionsanalyse ihrer Produkte. Unter

Verwendung von Kernmutanten konnten auf diese Weise Plastiden-importierte Regulationsfaktoren charakterisiert werden, die die Expression vieler plastidärer Gene kontrollieren (Barkan und Goldschmidt-Clermont 2000). Da die meisten plastidären Gene, die für ein Photosyntheseprotein kodieren, durch Kern-exprimierte Faktoren reguliert werden, wiesen solche spezifischen Kernmutanten einen typischen Photosynthese-defekten Phänotyp auf. Dieser zeichnet sich in der Regel durch eine auf den reduzierten Chlorophyllgehalt zurückzuführende blassgrüne Blattfarbe und eine starke Chlorophyll-Fluoreszenz (‚high chlorophyll fluorescence', HCF) aus. Zudem können solche Mutanten ausschließlich unter heterotrophen Wachstumsbedingungen überleben. Bekannte Beispiele für diesen Phänotyp sind Mutanten von Mais (Barkan et al. 1986, Cook und Miles 1988) und *Arabidopsis* (Dinkins et al. 1994, Meurer et al. 1996).

Die Deletion Plastiden-kodierter Gene mit Hilfe der Chloroplasten-Transformation ist ebenfalls eine weit verbreitete Methode zur Charakterisierung plastidärer Gene. Auf diesem Weg wurden die Funktionen verschiedener Gene und Genfamilien analysiert, wie die der *ndh*-Gene (Burrows et al. 1998, Kofer et al. 1998a, Shikanai et al. 1998), der *rpo*-Gene (Allison et al. 1996, De Santis-Maciossek et al. 1999, Krause et al. 2000), der *pet*-Gene (Monde et al. 2000a, Monde et al. 2000b), der *ycf*-Gene (Ruf et al. 1997, Hager et al. 1999, Drescher et al. 2000), der *psb*-Gene (Bock et al. 1994, Hager et al. 2002) und des *sprA*-Gens (Sugita et al. 1997). In all diesen Fällen wurde das *aadA*-Gen durch zielgenaue Integration in die kodierenden Bereiche inseriert oder entsprechende Sequenzen durch die Insertion entfernt, um so die erwünschte Disruption bzw. Deletion zu erreichen. Bei den hier genannten Beispielen wurden mit Ausnahme von *ycf1*, *ycf2* und *sprA* immer Gene deletiert, die für Photosyntheseproteine selbst oder Photosynthese-verwandte Proteine kodieren. Dementsprechend zeigten die Mutanten im homoplastomischen Zustand auch typisch Photosynthese-defekte Phänotypen.

Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll die Möglichkeit der Deletion und Rekonstitution eines Plastiden-kodierten Photosynthese-Gens durch eine Zwei-Schritt-Transformation gezeigt werden. Um gleichzeitig noch einen optischen Selektionsmarker zu etablieren, wurde das *petA*-Gen dafür ausgesucht, welches für das Schlüssel-Protein des Cytochrom b_6/f-Komplexes in der photosynthetischen Membran der Chloroplasten kodiert, das Cytochrom *f* (cyt *f*). Das *petA*-Gen selbst ist am Ende des aus 4 Genen bestehenden *psaI*-Operons (bestehend aus *psaI-ycf4-ycf10-petA*) lokalisiert, welches sich in der ‚large single copy (LSC) region' des

plastidären Genoms von *Nicotiana tabacum* befindet. Wie in Monde et al. (2000a) beschrieben, führt die Deletion des *petA*-Gens zu einer deutlichen Reduktion des Chlorophyllgehalts, was sich in schwach grünen Blättern zeigt. Das fehlende *petA*-Genprodukt führt zum Verlust eines funktionstüchtigen Cytochrom b_6/f-Komplexes, wodurch der Elektronenfluss zwischen den Photosystemen II und I unterbrochen wird. Der daraus resultierende Elektronenstau im Photosystem II führt bei Anregung durch UV-Licht in mutanten Pflanzen zu einer starken Chlorophyll-Fluoreszenz (Monde et al. 2000a).
Die Idee der Zwei-Schritt-Methode beruht darauf, in zwei aufeinanderfolgenden Transformationsexperimenten erst das *petA*-Gen zu deletieren und anschließend wieder zu rekonstituieren. Die Deletion des *petA*-Gens sollte durch Insertion des *aadA*-Gens erreicht werden. Primäre Transformanten sollten sich neben der Resistenz gegenüber Spektinomycin und Streptomycin auch durch einen sichtbaren mutanten Phänotyp auszeichnen. Im zweiten Transformationsschritt sollte das *petA*-Gen wieder eingeführt und dabei gleichzeitig das *aadA*-Gen aus dem Plastom entfernt werden. Zusätzlich sollte noch ein neuer Selektionsmarker in das Tabakplastom integriert werden, mit dessen Hilfe rekonstituierte Transformanten selektiert werden können. Neben der wiedererlangten Fähigkeit zum autotrophen Wachstum, sollten sich sekundäre Transformanten bezüglich der Pigmentierung auch durch ihren Wildtyp-Phänotyp auszeichnen. Für die Selektion rekonstituierter Linien sollte ein neuer Selektionsmarker etabliert werden, das *aphA-6*-Gen, welches kürzlich als effizienter Plastidenmarker für *Chlamydomonas* beschrieben wurde (Bateman und Purton 2000). Bevor jedoch die Rekonstitution von Δ*petA*-Mutanten mit Hilfe des *aphA-6*-Gens gezeigt werden kann, sollte die generelle Verwendbarkeit des aus *Acinetobacter baumannii* stammenden Gens (Martin et al. 1988) für die Chloroplasten-Transformation in Tabak gezeigt werden. Die Besonderheit dieses Deletions-/Rekonstitutionsansatzes für die Chloroplasten-Transformation ist es, dass alle grünen Regenerate aus Rekonstitutionsexperimenten aufgrund ihres Phänotyps garantiert Plastiden-transformiert sind. Genau darin sollte auch der Vorteil dieser Methode verglichen zu herkömmlichen Transformations- und Selektionsprotokollen liegen.

1.4 Markerfreie Plastidentransformanten

Stabil integrierte Markergene dienen ausschließlich der Selektion transformierter Pflanzenzellen und haben nach der Selektion der Transformanten keine weiteren

Funktionen in den transgenen Pflanzenlinien. Für die Entfernung dieser „überflüssigen“ Selektionsmarker aus transgenen Pflanzen sprechen mehrere Gründe: (1) Die ablehnende Haltung der Öffentlichkeit hinsichtlich genetisch veränderter Pflanzen im Allgemeinen und im besonderen Bezug auf Antibiotika-Resistenzgene, (2) Vermeidung der Transgen-Verbreitung über den Pollen, (3) Vermeidung eines möglichen „horizontalen Gentransfers“ und (4) Möglichkeit zur mehrfachen Verwendung des gleichen Markers für die Einführung mehrerer Gene in unterschiedliche Insertionsstellen.

Aus diesen Gründen wurden verschiedene Methoden entwickelt, um Markergene aus transgenen Pflanzen zu entfernen (zusammengefasst in Yoder und Goldsbrough 1994, Puchta 2000, Ebinuma et al. 2001, Hohn et al. 2001, Hare und Chua 2002). Parallel zu dieser Entwicklung wurden auch sogenannte positive Selektionssysteme entwickelt, bei denen transformierte Zellen im Vergleich zu nicht transformierten einen Stoffwechsel- oder Entwicklungsvorteil aufweisen. Die Durchführbarkeit der positiven Selektion in der Kerntransformation verschiedener Pflanzenarten konnte unter Verwendung unterschiedlicher Markergene gezeigt werden (Ebinuma et al. 1997, Haldrup et al. 1998, Negrotto et al. 2000). Auch wenn die Verwendung positiver Selektionsmarker eine interessante Alternative darstellt, löst sie nicht das Problem, dass der eingesetzte Marker nur der Selektion dient und später in transgenen Pflanzenlinien überflüssig ist. Daher war und ist die Entwicklung von Methoden zur Entfernung von Selektionsmarkern aus transgenen Pflanzen von großer Bedeutung. Bis heute wurden folgende Methoden etabliert: (i) Co-Transformation, (ii) Transposon-vermittelte Entfernung und (iii) Rekombinase-vermittelte Entfernung.

Die gleichzeitige Integration zweier Gene in das pflanzliche Kerngenom kann mit Hilfe der Co-Transformation erreicht werden. Wurden beide Gene auf unterschiedlichen Chromosomen integriert, kann der Selektionsmarker durch Kreuzung und Segregation vom anderen Gen getrennt und auf diese Weise entfernt werden (De Block und Debrouwer 1991, Komari et al. 1996). Eine weitere Möglichkeit zur Entfernung von Markergenen aus Kerntransformanten ist eine Transposon-vermittelte Umpositionierung des Markergens im Genom gefolgt von einem Segregationsschritt durch Kreuzung (Goldsbrough et al. 1993, Ebinuma et al. 1997). Die beiden oben angeführten Methoden weisen jedoch Unwägbarkeiten auf wie die Insertion auf unterschiedlichen Chromosomen und die zufällige Segregation bei der Kreuzung. Daher wurde auch aus zeitlichen Gründen nach effektiveren Lösungen gesucht. Die am weitesten verbreitete Methode ist dabei die Entfernung des Markergens aus dem pflanzlichen Genom mit Hilfe der punktgenauen

Rekombination (zusammengefasst in Ow 2002). Erstmals wurde dies unter Verwendung des Cre/*lox*-Systems des Bakteriophagen P1 gezeigt, bei dem DNA-Bereiche, die zwischen den spezifischen *lox*-Erkennungssequenzen liegen, von der Cre-Rekombinase herausgeschnitten und so entfernt wurden (Dale und Ow 1990, 1991, Odell et al. 1990, Baylay et al. 1992, Russell et al. 1992). Weitere Systeme der Rekombinase-vermittelten Entfernung von Gensequenzen aus dem pflanzlichen Kerngenom sind das ‚FLP/*FRT*'-System aus *Saccharomyces cerevisiae* (Lyznik et al. 1993, 1996, Lloyd und Davis 1994, Sonti et al. 1995, Kilby et al. 1995), das ‚R-*RS*'-System aus *Zygosaccharomyces rouxii* (Onouchi et al. 1991, 1995), das *attB*/*attP*-System des *Streptomyces*-Phagen ΦC31 (Ow et al. 2001) und das Gin-*gix*-System des Phagen Mu (Maeser und Kahmann 1991). Mit Ausnahme des letzten Beispiels, bei dem die Anreicherung der Gin-Rekombinase negative Auswirkungen auf die Pflanzenregeneration hatte, wurde in allen Fällen das Gen für die Rekombinase stabil ins Genom integriert. All diesen Ansätzen ist gemein, dass das für die Markerentfernung integrierte Rekombinasegen erst durch Kreuzung wieder aus den transgenen Pflanzen entfernt werden kann. Daher stellte das gleichzeitige Herausschneiden von Marker- und Rekombinasegen eine deutliche Verbesserung auf dem Gebiet der Rekombinase-vermittelten Entfernung des Markergens dar. Dabei wurden beide Gene von spezifischen Erkennungssequenzen eingerahmt, um dann - nach induzierter Expression der Rekombinase - aus transgenen Pflanzen entfernt zu werden (Gleave et al. 1999, Sugita et al. 1999, 2000, Zuo et al. 2001).

Auch in der Chloroplasten-Transformation werden bis auf wenige Ausnahmen Antibiotika-Resistenzgene als Selektionsmarker eingesetzt. Für Pflanzen mit genetisch veränderten Chloroplasten gelten daher ähnliche Gründe, den Selektionsmarker zu entfernen, wie für Kerntransformanten, wobei die maternale Vererbung der Chloroplasten die Transgen-Verbreitung über den Pollen ausschließt. Es wurden in den letzten Jahren auch auf dem Gebiet der Plastidentransformation Methoden entwickelt, um Antibiotika-Resistenzgene aus den Chloroplasten zu entfernen. Wegbereitend waren hier zwei Ansätze in *Chlamydomonas reinhardtii* (Fischer et al. 1996). Das Entfernen des Markergens wurde hier zum einen unter Zuhilfenahme sogenannter ‚direct repeats' erreicht, identischen Sequenzwiederholungen, die durch Rekombination miteinander dazwischenliegende Bereiche deletieren. Die zweite Methode beruhte auf der Verwendung der Co-Transformation in Kombination mit der Deletion eines essentiellen und eines nicht essentiellen Plastidengens. Der homoplastomische Zustand für die Deletion des nicht

essentiellen Gens konnte mit Hilfe des in das essentielle Gen integrierten Selektionsmarkers erreicht werden. Die nachfolgende Aufhebung des Selektionsdrucks führte zur numerischen Zunahme von Plastommolekülen mit einem intakten essentiellen Gen und gleichermaßen zum Verlust Marker-tragender Plastommoleküle.

Die Entfernung eines stabil integrierten Markergens aus dem Plastom höherer Pflanzen wurde erstmals von Iamtham und Day (2000) beschrieben, wobei auch hier ‚direct repeats' zum Herausschneiden dazwischenliegender DNA-Sequenzen eingesetzt wurden. Nach der stabilen Integration dreier verschiedener Markergene (*aadA*, *uidA*, *bar*) in das Tabakplastom wurden die Gene *aadA* und *bar* durch Rekombination zwischen zwei repetierenden Regelelementen (*psbA* 3'UTRs) herausgeschnitten. Dies geschah, nachdem homoplastomische Transformanten auf nicht selektives Medium transferiert worden waren. Die in dieser Veröffentlichung beschriebene Methode beruht auf einem schon länger bekannten Phänomen, dass identische Sequenzwiederholungen, vor allem in kurzen Abständen, zum Herausschneiden dazwischenliegender DNA-Bereiche führen (Svab und Maliga 1993, Shikanai et al. 1998, Eibl et al. 1999, Hajdukiewicz et al. 2001). All diese Befunde zeigen deutlich, dass die Wahl plastidärer Regelelemente für Chloroplasten-Transformationen gründlich überlegt sein sollte, um ein ungewolltes Entfernen plastidärer Sequenzen durch intrachromosomale Rekombination zu vermeiden.

Eine weitere Methode zur Entfernung von Markergenen aus dem Chloroplastengenom ist das aus der Kerntransformation übernommene Cre/*lox*-System. Auch hier wurden in mehreren Beispielen verschiedene Markergene (*aadA*, *codA*) von kurzen *lox*-Erkennungssequenzen umrahmt, die dann mit Hilfe einer in den Kern integrierten und in die Plastiden importierten Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden konnten (Hajdukiewicz et al. 2001, Corneille et al. 2001). Die Etablierung solcher Methoden zur Entfernung ‚ungewollter' Antibiotikum-Resistenzmarker aus Plastidentransformanten eröffnet neue Möglichkeiten für die Chloroplasten-Transformation vor allem in angewandten Bereichen der Biotechnologie. Jedoch muss auch hier berücksichtigt werden, dass das *cre*-Gen zusammen mit einem Antibiotikum-Resistenzgen (Selektionsmarker) ins Kerngenom integriert wurde, welches wie das *cre*-Gen selbst nur durch Kreuzung aus transplastomen Pflanzen entfernt werden kann.

Die von Daniell et al. (2001a) beschriebe Methode zur Erzeugung ‚markerfreier' Plastidentransformanten mit Hilfe eines nicht antibiotischen Selektionsmarkers erscheint zwar im ersten Moment als sinnvolle Alternative, es löst aber nicht das Problem, dass transformierte Pflanzen das „überflüssige" Selektionsgen integriert haben. Zudem lässt

sich das als Selektionsmarker verwendete *badh*-Gen nicht auf alle Pflanzenarten übertragen, da z.B. mehrere biotechnologisch relevante Arten wie Spinat (*Spinacea oleracea*), Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) bereits eine eigene Betainaldehyd-Dehydrogenase besitzen.

Neben der nachträglichen Entfernung des Antibiotikum-Resistenzmarkers aus transplastomen Pflanzen besteht auch die Möglichkeit, einen solchen Marker erst gar nicht zur Selektion zu verwenden. Diese Methode wurde bei den ersten Chloroplasten-Transformationen in *Chlamydomonas* angewandt, indem bei Photosynthese-defizienten Linien das deletierte Gen ins plastidäre Genom wieder eingefügt wurde (Boynton et al. 1988, Blowers et al. 1989, Kindle et al. 1991). Hier konnte in verschiedenen plastidären *atpB*-Mutanten der mutante Plastombereich durch Wildtyp-DNA ersetzt werden, die mit Hilfe der biolistischen Methode in die Chloroplasten eingeführt worden war. Komplementierte Chloroplastengenome exprimierten nun wieder das zur Photosynthese notwendige *atpB*-Genprodukt, was transformierte Zellen - im Gegensatz zu nicht transformierten - zu autotrophem Wachstum befähigte. Mit Hilfe dieser Komplementations-Technik ist es möglich, jegliche gewünschten Gene zusätzlich zum *atpB*-Marker in das plastidäre Genom von *Chlamydomonas* zu inserieren, ohne einen unerwünschten Resistenzmarker integrieren zu müssen.

Zielsetzung dieser Arbeit

Die Rekonstitution Photosynthese-defizienter Mutanten unter Verwendung photosynthetischer Selektionsbedingungen konnte bis jetzt noch nicht auf höhere Pflanzen übertragen werden. In dieser Arbeit sollte versucht werden, das plastidäre *petA*-Gen als photosynthetischen Selektionsmarker für die Chloroplasten-Transformation in Tabak einzusetzen. In Abschnitt 1.3 wurde die grundsätzliche Frage beschrieben, inwiefern die Deletion und darauffolgende Rekonstitution des plastidären *petA*-Gens möglich ist. Neben diesem Ansatz sollte in der hier vorgelegten Arbeit auch der Versuch unternommen werden, dass wiedereingeführte *petA*-Gen in Kombination mit geeigneten Selektionsbedingungen direkt als Selektionsmarker zu verwenden. Abbildung 1.1 zeigt schematisch die Idee zur Herstellung markerfreier Plastidentransformanten unter Verwendung der Deletion und darauffolgenden Rekonstitution des *petA*-Gens. Die Etablierung einer solchen Methode würde vor allem auch das Problem überflüssiger Selektionsmarker in transplastomen Pflanzen lösen, da nur das deletierte Photosynthese-

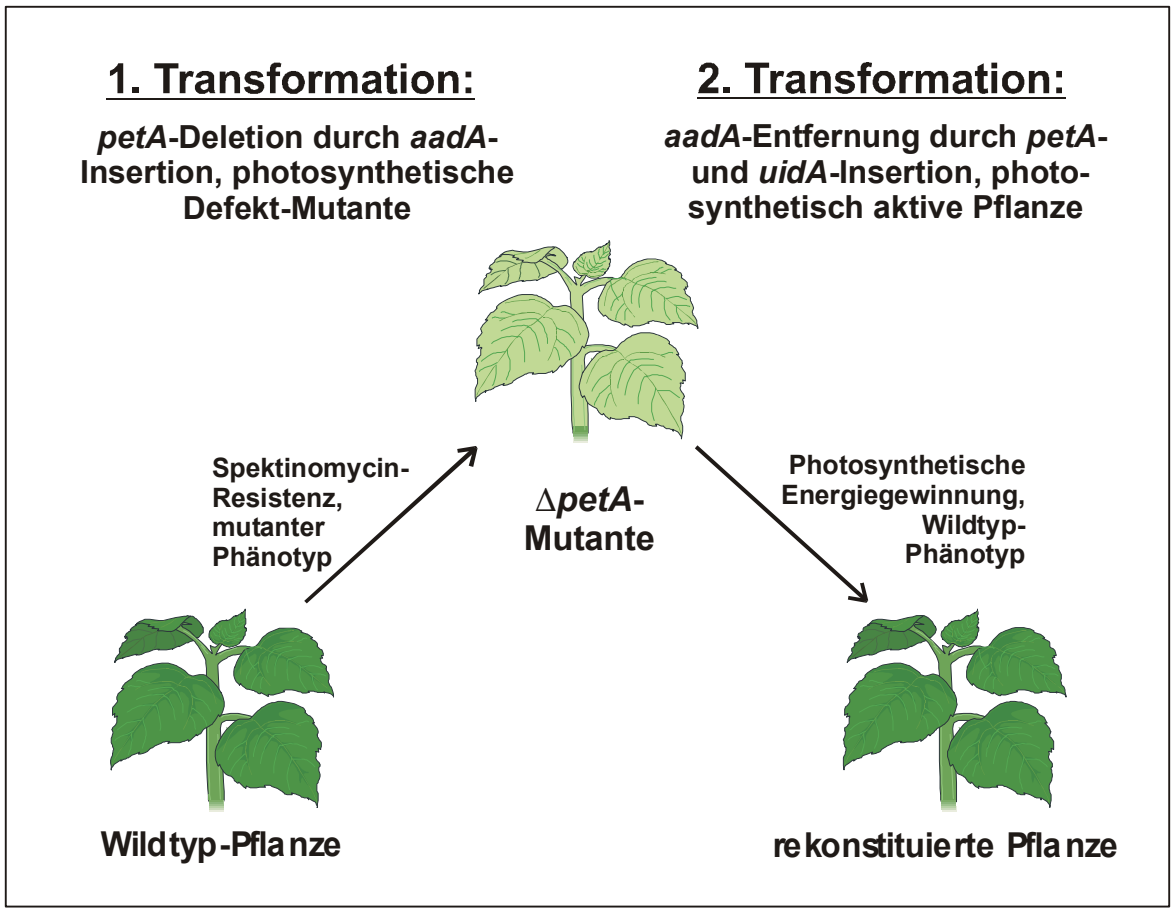


Abbildung 1.1 Schematische Übersicht zur Herstellung markerfreier transplastomer Tabakpflanzen.

Gen wiedereingeführt werden würde. Zudem würde der Wildtyp-Phänotyp rekonstituierter Regenerate und die wiedererlangte Fähigkeit zum autotrophem Wachstum die Selektion plastidärer Transformanten erleichtern und aufwendige Analysen per PCR oder Southern überflüssig machen. Würde sich die Fähigkeit zu autotrophem Wachstum als Selektionskriterium für ungeeignet erweisen, sollte nach einem neuen Weg zur Entfernung des bei der Rekonstitution unverzichtbaren Resistenzmarkers gesucht werden. Zusammenfassend sollte in dieser Arbeit eine Methode etabliert werden, mit deren Hilfe markerfreie Chloroplasten-Transformanten hergestellt werden können. Dabei sollte neben dem optischen Selektionskriterium der *petA*-Rekonstitution auch die Komplementation einer plastidären Pigmentmutante auf physiologischer Ebene zur Selektion von Chloroplasten-Transformanten eingesetzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Biochemikalien, Enzyme

Alle hier nicht explizit aufgeführten Standardchemikalien (anorganische Salze, Säuren, übliche organische Verbindungen, Lösungsmittel) wurden im Reinheitsgrad ‚pro analysi' verwendet und von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Duchefa Biochemie (Harlem, Niederlande) bezogen. Restriktionsenzyme und andere Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, von MBI (St. Leon-Rot) und Promega (Mannheim) bezogen.

Im folgenden sind spezielle Substanzen und Enzyme aufgeführt, die ebenfalls im Reinheitsgrad ‚pro analysi' für die Molekularbiologie und Zellkultur eingesetzt wurden:

Substanz	**Hersteller**
Agarose (peqGoldUniversal Agarose)	Peqlab, Erlangen
Alginat (aus *Macrocystis pyrifera*)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin	ICN Biomedicals, Eschwege
B5-Salze	Duchefa Biochemie, Harlem (Niederlande)
6-Benzylaminopurine (BAP, Lösung)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cellulase „Onozuka" R10	Duchefa Biochemie, Harlem (Holland)
Dichlorisocyanursäure	Poolpflege Großhandel, Egmating
Macerase „Maceroenzyme" R10	Duchefa Biochemie, Harlem (Niederlande)
MS-Salze	Duchefa Biochemie, Harlem (Niederlande)
N-Lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
α-Naphthylessigsäure (NAA, Lösung)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pfu-Polymerase	Promega, Mannheim
Polyethylenglykol 1500 (PEG_{1500})	Merck, Darmstadt
Polypuffer 74	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
RNase A	Roth, Karlsruhe
Saccharose	ICN Biomedicals, Eschwege
Taq-Polymerase	MBI, St. Leon-Rot; Qiagen, Hilden
X-Gluc (5-Bromo-4-chlor-3indolyl-ß-D-glucoronid)	Duchefa Biochemie, Harlem (Niederlande)

Molekularbiologische ‚kits'

DIG DNA labeling and detection kit	Roche, Mannheim
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
PCR DIG probe synthesis kit	Roche, Mannheim
pGEM-T Vector Systems	Promega, Mannheim
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA ligation kit	Roche, Mannheim

2.2 DNA, Organismen

DNA

DNA-Längenstandard VII, Dioxigenin-markiert (81 bp – 8576 bp)	Roche, Mannheim
dNTPs	MBI, St. Leon-Rot
λ DNA/*Eco*130I/*Mlu*I - DNA Size Marker (925 bp – 26282 bp)	MBI, St. Leon-Rot
MassRuler DNA Ladder (100 bp - 10.000 bp)	MBI, St. Leon-Rot
Oligonukleotide (Primer)	MWG Biotech, Ebersberg
pUC19 Plasmid	New England Biolabs, Schwabach
Supercoiled DNA Ladder (2 kb – 10 kb)	Promega, Mannheim
aadA-Gen (aus ‚pUC16S *aadA Sma*I vollst')	C. Eibl, ICON Genetics, Freising
aphA-6-Gen (aus ‚pSK.KmR')	S. Purton, UCL, UK
uidA-Gen (aus ‚pUC16S RBS *uidA* 3'*rbcL*')	C. Eibl, ICON Genetics, Freising

Organismen

Escherichia coli JM109 (Hanahan 1983; Promega, Mannheim),

Nicotiana tabacum L. cv. Petit Havana (wird in dieser Arbeit vereinfacht als „Tabak" bezeichnet).

2.3 Geräte, Verbrauchsmaterial, Software

Für die standardmäßige Ausrüstung des Labors standen vornehmlich Geräte der Firmen Merck Eurolab (Bruchsal), Gilson (Bad Camberg), Biorad (München), Kendro/Heraeus (Hanau) und LTF Labortechnik (Wasserburg) zur Verfügung. Verbrauchsmaterial für die Molekularbiologie wurde weitgehend von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen) und Gilson (Bad Camberg), für die Gewebekultur von Greiner und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.
Als Standardsoftware für die Computerarbeit wurde Windows Office 2000 verwendet. Darüber hinaus wurden folgende Softwareprogramme verwendet: Vektor NTI 7.0 (InforMax, Oxford, UK), Adobe Photoshop LE 5.0 (Adobe, Moutain View, USA), Acrobat Reader 5.0 (Adobe) und Corel Draw 8.0 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada). Digitale Fotoaufnahmen wurden mit der Kamera Coolpix 990 (Nikon) gemacht, Farbdrucke unter Verwendung des Druckers HP DeskJet 930C (Hewlett Packard), zum Scannen wurde der Scanner HP ScanJet 5300C (Hewlett Packard) verwendet.

2.4 Herstellung rekombinanter Plasmide

2.4.1 Allgemeine Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wie Restriktion, Gelelektrophorese, Erzeugung von ‚blunt ends', Dephosphorylierung, Ligation, Bakterientransformation und Blau-Weiß-Selektion wurden nach Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1999) durchgeführt oder nach den Protokollen der Hersteller. Für die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder Lösungen wurden Reagentien-‚kits' der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Weitere molekularbiologische Techniken sind im folgenden aufgeführt.

2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen (‚miniprep') zur Analyse rekombinanter Bakterienklone wurde ein vereinfachtes Verfahren der Methode „Miniprep durch alkalische Lyse" (Birnboim und Doly, 1979) angewandt: 1,5 ml LB-Bakterienkulturmedium mit 150 mg/l Ampicillin wurden in 2 ml Eppendorfgefäße

abgefüllt und mit einem Zahnstocher angeimpft. Die in diesen Gefäßen über Nacht im Schüttler (220 rpm) bei 37°C herangewachsenen Bakterien wurden im gleichen Gefäß pelletiert (Tischzentrifuge, 3 min, 15.000 rpm), der Überstand entfernt und das Pellet in 350 µl TENS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl 3 M Kalium-Acetat und kräftigem Mischen wurde 3 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. 400 µl vom Überstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml Ethanol (2,5-faches Volumen) gefällt. Das nach erneuter Zentrifugation (10 min, 15.000 rpm) entstandene DNA-Pellet wurde einmal in 70 %-igem Ethanol (200 µl) gewaschen und dann in 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) oder H_2O_{bd} aufgenommen. Zusätzliche Zugabe von RNase A (10 µg/ml) dient dem Abbau restlicher RNA. Zur vollständigen Lösung wurde die DNA 15-30 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die so erhaltene DNA konnte mit allen verwendeten Restriktionsenzymen problemlos geschnitten werden und eignete sich auch als PCR-‚template'.

TENS-Puffer

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

Plasmid-DNA, die für Klonierungen und Sequenzierungen verwendet werden sollte, wurde mit Hilfe des ‚QIAprep Spin Miniprep Kits' nach Herstellerprotokoll isoliert. Größere Mengen an Plasmid-DNA für die Plastidentransformation wurden unter Verwendung des ‚QIAfilter Plasmid Midi/Maxi Kits' isoliert. Plasmid-DNA für die PEG-Transformation von Protoplasten wurde nochmals mit 2,5 Volumen 100 %-igem Ethanol und $^1/_{10}$ Volumen 3 M Natrium-Acetat gefällt und anschließend in TE Puffer (pH 5,6) in einer Konzentration von mindestens 1 µg/µl aufgenommen.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR-Ansätze wurden in einem Volumen von 25-50 µl durchgeführt und enthielten neben dem DNA-‚template' 0,1 Volumen Reaktionspuffer, 0,2 mM dNTPs,

Tab. 2.1 Primer

Name	Sequenzen, 5'→3'	Bindungsposition	Verwendungszweck
o2	CAGGAAACAGCTATGACC	464-481 [a]	Nachweis der Integration des gesamten Transformationsvektors
o3	GGCATCAGAGCAGATTG	152-168 [a]	Nachweis der Integration des gesamten Transformationsvektors
o13	GGGAATTCCATATGGTATAAAA CTCATGTGTGTAAGAAA	63335-63359 [b]	Klonierung rechte Flanke von pICF558 (*Nde*I)
o14	TCCCCCGGGGGTCCAATCATTG ATCGCGAAA	64334-64313 [b]	Klonierung rechte Flanke von pICF558 (*Sma*I)
o15	TTCCCCGGGTTCTAAATAGAAA GAAAGTCAAATTTG	65598-65624 [b]	Klonierung linke Flanke von pICF558 (*Sma*I)
o16	ACATGCATGCGAATCAATAAGA TTCTCTTAGCTC	66597-66574 [b]	Klonierung linke Flanke von pICF558 (*Sph*I)
o58	TATTCCGACTTCCCCAGAGC	109138-109157 [b]	Nachweis der Integration des *aphA-6*-Gens im ‚inverted repeat B' (IR_B)
o59	TGCTGGCCGTACATTTGTACG	481-501 [c]	Nachweis des *aadA*-Gens
o60	CACTACATTTCGCTCATCGCC	939-959 [c]	Nachweis des *aadA*-Gens
o61	TCACACCGATACCATCAGCG	2815-2834 [d]	Nachweis des *uidA*-Gens
o62	ATTGTTTGCCTCCCTGCTGC	3253-3272 [d]	Nachweis des *uidA*-Gens
o71	TCCCCCGGGTAGAAAACTATTG ATACGTCTTATGG	65597-65572 [b]	Klonierung linke Flanke pICF597 (*Sma*I)
o74	CATGCCATGGTACGTCCTGTAG AA	1470-1483 [d]	Klonierung des *uidA*-Gens (*Nco*I)
o75	TGCTCTAGATCATTGTTTGCCT CCCTGCTGC	3253-3274 [d]	Klonierung des *uidA*-Gens (*Xba*I)
o110	CATGCCATGGTCCAATCATTGA TCGCGAAA	64332-64313 [b]	Klonierung rechte Flanke von pICF596 (*Nco*I)
o111	AAAACTGCAGATTCGCAGATTT GTCGACATCAA	65298-65320 [b]	Klonierung linke Flanke von pICF596 (*Pst*I)
o116	AAAATAGATTCATTAGTCCGAT ACC	63308-63332 [b]	Nachweis der *petA*-Deletion bzw. der *petA*-Rekonstitution
o138	AATCGTACCAGTCTCTACTGG	66667-66687 [b]	Nachweis des *petA*-Deletion bzw. der *petA*-Rekonstitution
o168	TCAGTCGCCATCGGATGTTT	168-187 [e]	Nachweis des *aphA-6*-Gens
o169	ACCAATCTTTCTTCAACACG	628-647 [e]	Nachweis des *aphA-6*-Gens
o253	GACTAGTCTAGAAATTCATTTC GGCCAATTG	65297-65273 [b]	Klonierung rechte Flanke von pICF596 (*Spe*I)

Unterstrichene Sequenzbereiche zeigen die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme an;

[a] pUC19 Plasmid-Sequenz gemäß NCBI Zugangsnummer M77789 (Norrander et al. 1983)

[b] *Nicotiana tabacum* Plastom-Sequenz gemäß NCBI Zugangsnummer Z00044 (Shinozaki et al. 1986a und b)

[c] *aadA* Gen-Sequenz gemäß NCBI Zugangsnummer M10241 (Hollingshead und Vapnek 1985)

[d] *uidA* Gen-Sequenz gemäß NCBI Zugangsnummer M14641 (Jefferson et al. 1986)

[e] *aphA*-6 Gen-Sequenz gemäß NCBI Zugangsnummer X07753 (Martin et al. 1988)

0,8 µM je Primer und 0,5-1 U *Taq*-Polymerase, aufgefüllt mit H_2O_{bd}. In der Regel erfolgte die Amplifikation in 30 Zyklen wie folgt: Denaturierung bei 95°C für 3 min, 1 Zyklus; Denaturierung bei 95°C für 30-45 sek, ‚annealing' bei 55°C für 30-45 sek, Polymerisation (‚elongation') bei 72°C für 1-4 min, 30 Zyklen; abschließende Polymerisation (‚elongation') bei 72°C für 10 min. Die PCR-Reaktionen wurden in den Geräten icyclerThermalCycler (Biorad, München) und Primus 25 (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Tabelle 2.1 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Primer, deren Sequenz, Bindungsposition und Verwendungszweck auf.
Zum Nachweis einer erfolgreichen Vektor-Klonierung in Bakterienklonen wurde die sogenannte Methode der Kolonie-PCR eingesetzt. Hierfür wurden 25 µl PCR-Ansätze (ohne DNA-‚template') mit einem Zahnstocher angeimpft, mit dem zuvor eine Bakterienkolonie gepickt worden war. Zudem wurde noch ein Ausstrich auf einer LB_{Amp}-Agarplatte gemacht. Für die Kolonie-PCR ist es ausreichend, Bakterien in den PCR-Ansatz zu geben, die die Matrizen-DNA enthalten. Für den Aufschluss der Bakterien wurde die anfängliche Denaturierungszeit auf 10 min erhöht.

2.4.4 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der korrekten Sequenz wurden PCR-amplifzierte DNA-Fragmente bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) sequenziert.

2.4.5 Klonierung der Transformationsvektoren

Für die Klonierung der Plastiden-Transformationsvektoren wurden die homologen Flanken unter Verwendung geeigneter Primer mittels PCR amplifiziert und zusammen mit den Reportergenen bzw. Reportergen-Kassetten in den pUC19-Vektor kloniert. Abbildung 2.1 zeigt die Plastom-Insertionsstellen und die verschiedenen Vektoren, die für die Deletion und Rekonstitution des *petA*-Gens eingesetzt wurden.
Alle Plastom-homologen Fragmente für die Flanken wurden mit Hilfe der *Pfu*- oder *Taq*-Polymerase amplifiziert. Für die Weiterklonierung wurden Restriktionsschnittstellen an die Fragmentenden angehängt, die in die Primersequenzen inkorporiert worden waren. In seltenen Fällen wurden die amplifizierten Fragmente ‚blunt' in den pGEM-Vektor (pGEM-T Vector Systems, Promega, Mannheim) kloniert, nachdem mit Hilfe der T4 DNA-

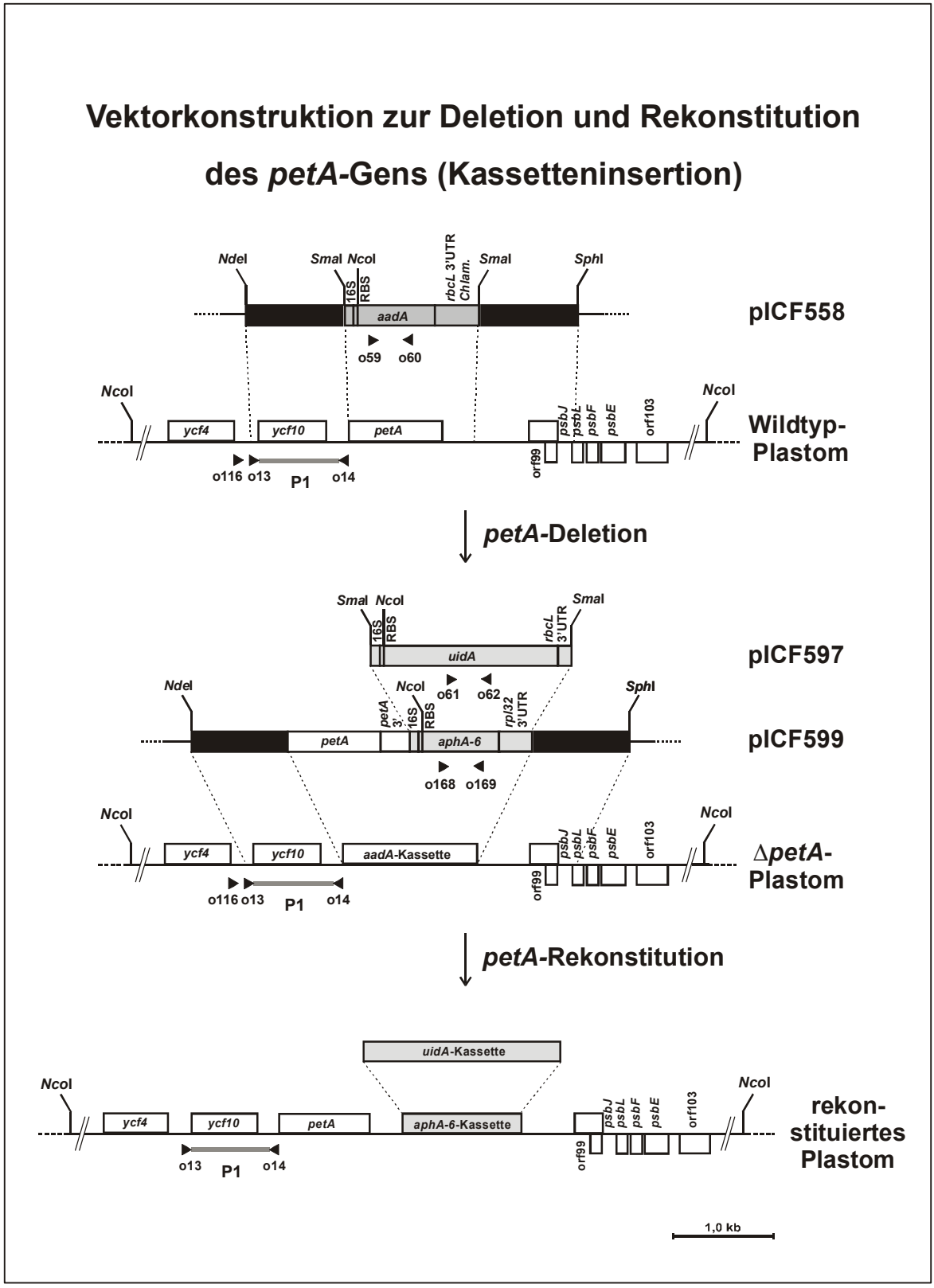
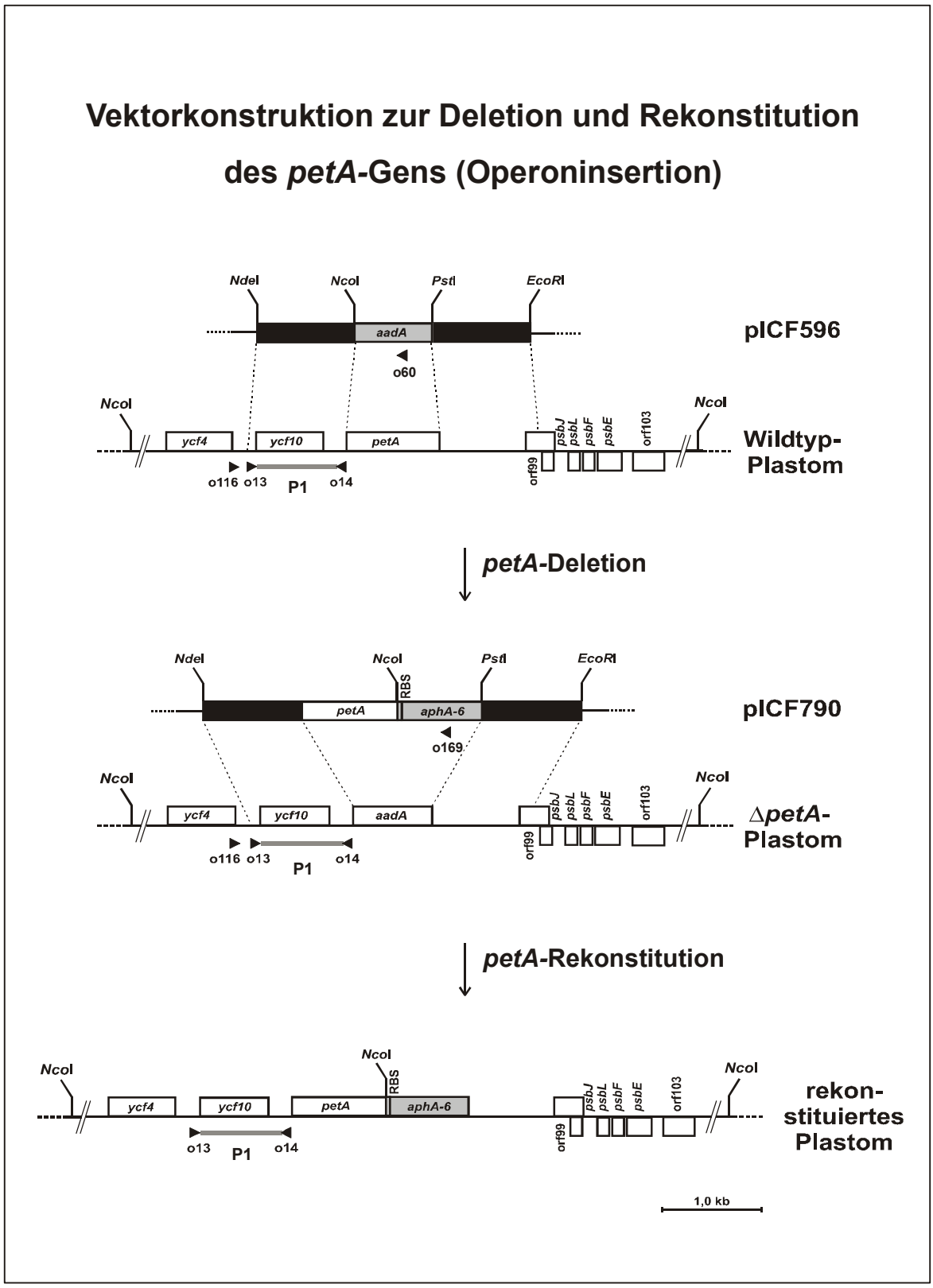


Abbildung 2.1 Klonierung der Transformationsvektoren für die Deletion und Rekonstitution des *petA*-Gens. Schematische Darstellung der Vektor-Konstruktion und Plastom-Insertion der Markergene *aadA*, *aphA-6* und *uidA*. Die Verwendung von Marker-Expressionskassetten für die Deletion (pICF558) und Rekonstitution (pICF597, pICF599) des *petA*-Gens ist auf Seite 24



gezeigt, die Methode der Operoninsertion von Markergenen für die Deletion (pICF596) und Rekonstitution (pICF790) des *petA*-Gens auf Seite 25. Die für die Klonierung und Southern-Analyse wichtigen Restriktionsschnittstellen sind angezeigt, sowie die Primer-Bindestellen für PCR-Analyse und Sonden-Herstellung (P1).

Polymerase ein dATP-Molekül an die 5'-Enden angehängt wurde (‚A-tailing', nur notwendig für *Pfu*-amplifizierte Fragmente). Aus dem resultierenden Konstrukt konnten die amplifizierten Fragmente mit geeigneten Restriktionsenzymen herausgeschnitten und für weitere Klonierungsschritte eingesetzt werden.

2.5 Chloroplasten-Transformation

Im folgenden werden 3 Methoden beschrieben, um Chloroplasten von Tabakpflanzen unter Zuhilfenahme geeigneter Vektoren genetisch zu verändern. Neben den Standardmethoden zur Transformation von Plastiden (Blatt-Beschuss und Polyethylenglykol-Behandlung von Protoplasten) wurde eine neue Methode etabliert, der Beschuss von eingebetteten Mikrokolonien. Tabelle 2.2 listet die Zusammensetzung aller verwendeten Medium auf.

2.5.1 *In vitro*-Kultur von Tabakpflanzen

Für die Sterilkultur von Tabakpflanzen wurden Samen in Petrischalen Oberflächen-sterilisiert (1 min 70 %-iger Ethanol, 10 min 5 % Dichlorisocyanursäure-Lösung, 3x10 min H_2O_{bd} steril) und auf B5-Medium ausgelegt. Nach einer Keimungszeit von 1-2 Wochen wurden die Keimlinge in Kirschgläser mit gasdurchlässigen Stopfen transferiert und in der Klimakammer bei 27°C ± 1°C bei Standardbeleuchtung (70 ± 10 µmol·m^{-2}·s^{-1}, 16 h Licht/Tag = Langtag) weiterkultiviert. Blätter 3-4 Wochen alter Pflanzen wurden für den Blatt-Beschuss bzw. für die Protoplasten-Isolierung verwendet.

Sprosse homoplastomischer Δ*petA*-Linien wurden zur Pflanzenregeneration auf MS- bzw. RS-Medium transferiert und unter Schwachlicht-Bedingungen (5,0 ± 1,0 µmol·m^{-2}·s^{-1}, 16 h Tag, 27°C ± 1°C) herangezogen. Blätter dieser *in vitro* angezogenen Pflanzen wurden für die Protoplasten-Isolierung in den Rekonstitutionsexperimenten verwendet.

2.5.2 ‚Particle gun'-Transformation von Tabak-Blättern

Für die Transformation von Tabak-Chloroplasten wurden Blätter 3-4 Wochen alter, steril angezogener Pflanzen mit der Oberseite nach unten auf RMOP-Medium gelegt und für einen Tag im Kulturraum inkubiert. Darauffolgend wurden die Blätter mit DNA-

Tab. 2.2 Pflanzen-Kulturmedien

		B5	RMOP	MS	RS	F-PIN	F-PCN
Makro-Salze	NH_4NO_3		1650				
	KNO_3	2500	1900	1900	3032	1012	1012
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150	440	440	332	440	440
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250	370	180,5	1230	370	370
	KH_2PO_4		170	170	170	170	170
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150					
	$(NH_4)_2SO_4$	134					
	$(NH_4)_2NO_3$			1650			
	$NaNO_3$				170		
	$Ca(NO_3)_2$				708		
	2 M NH_4-Succinat					10 ml	10 ml
Mikro-Salze	Na-EDTA-Fe(III)	40	40	40	40	40	40
	KJ	0,75	0,83	0,83	0,83	0,75	0,75
	H_3BO_3	3,00	6,20	6,20	6,20	3,00	3,00
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	10,00	22,3	22,3	22,3	10,00	10,00
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,00	8,60	8,60	8,60	2,00	2,00
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Vitamine	Inosit	100	100			200	200
	Pyridoxin-HCl	1				2	2
	Thiamin-HCl	10	1			1	1
	Biotin					0,02	0,02
	Nicotinsäure	1				2	2
Sonstiges	BAP		1 ml			1 ml	1 ml
	NAA		0,1 ml			0,1 ml	0,1 ml
	Polypuffer 74					10 ml	10 ml
	Saccharose	20000	30000	30000	30000	130000	20000
	Glucose						65000
	pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
	Osmolarität					550 mOsm/l	550 mOsm/l
	Agar	7000	7000	7000	7000		
	H_2O ad 1 l:	bidest	bidest	bidest	bidest	ultrafilt.	ultrafilt.

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°C aufbewahrt wurden; NH_4-Succinat als 2 M Stammlösung (siehe Abschnitt 2.5.3). B5-Medium nach Gamborg et al. (1968), RMOP nach Svab et al. (1990), MS nach Murashige und Skoog (1962), RS nach Dovzhenko (2001) und F-PCN und F-PIN nach Dovzhenko et al. (1998).

beladenen Goldpartikeln (0,6 µm, Biorad, München) in der ‚particle gun' beschossen. Für die Beladung wurden die Goldpartikel (35 µl einer Goldpartikel-Suspension mit 60 mg/ml

in 100 %-igem Ethanol) durch Zentrifugation pelletiert und in 1 ml sterilem H_2O_{bd} gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 230 µl H_2O_{bd} aufgenommen und 250 µl 2,5 M $CaCl_2$ und 20 µl Plasmid-Lösung (25 µg DNA) zugegeben. Nach gründlicher Resuspendierung der Goldpartikel wurden 50 µl 0,1 M Spermidin-Lösung zugegeben, gut gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert, wobei alle 2 min erneut gemischt wurde. Nach weiterem Zentrifugieren wurden die Goldpartikel zweimal mit 600 µl 100 %-igem Ethanol gewaschen und dann in 72 µl 100 %-igen Ethanol aufgenommen. Jeweils 5,4 µl dieser Gold-Suspension wurde für den Beschuss eines Blattes auf einen Macrocarrier pipettiert. Der Beschuss selbst erfolgte in einer Biorad ‚particle gun', Model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System, unter Verwendung folgender Parameter: ‚rupture disc' 900 psi, Vakuum 26-27 inches Hg, Macrocarrier auf höchster Stufe, Petrischalen mit Blättern auf Stufe 3.

2.5.3 PEG-Transformation von Protoplasten

Zur Isolierung von Protoplasten wurden 2-3 Blätter steril angezogener, 3-4 Wochen alter Tabakpflanzen in feine Streifen (~ 1 mm) geschnitten und in F-PIN Medium gelegt. Nach kurzer Präplasmolyse (0,5-1 h) wurden je 250 µl 10 %-ige Enzymlösung (Cellulase und Macerase) zugegeben und der Verdau über Nacht (ca. 14-16 h) im Dunkeln bei 27°C inkubiert. Für die Protoplasten-Isolierung aus homoplastomischen Δ*petA*-Pflanzen wurden ca. 10-15 Blätter in feine Streifen geschnitten und je 500 µl 10 %-ige Enzymlösung eingesetzt. Nach dem Verdau wurde die Lösung durch ein Metallnetz (Maschengröße

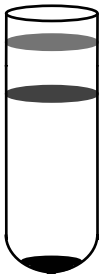


Abb. 2.2 Dichtegradienten-Zentrifugation. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Medien F-PIN (unten, höhere Dichte) und MMM (oben, geringere Dichte) kommt es zur Trennung von geschädigten (oben) und intakten Protoplasten (Mitte) sowie Zelltrümmern (unten).

100 µm) in Polystyrolröhrchen (Gewebekulturröhrchen) filtriert, vorsichtig mit 2 ml MMM-Medium überschichtet und 10 min bei 70 g zentrifugiert (Dichtegradienten-Zentrifugation, siehe Abb. 2.2). Die Bande an der Phasengrenze zwischen F-PIN- und MMM-Medium mit den intakten Protoplasten wurde abgesaugt, in ein neues

Gewebekulturröhrchen pipettiert und mit Transformations-Medium auf 10 ml aufgefüllt. Nach Bestimmung der Protoplasten-Dichte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurden die Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 50 g pelletiert und mit Transformations-Medium auf eine Dichte von $5 \cdot 10^6$ PP/ml eingestellt.

10 %-ige Enzymlösungen (1 l)

Cellulase R10 oder Macerozym R10 ..... 100 g
Saccharose ..... 137 g

2 M Ammoniumsuccinat (100 ml)

Bernsteinsäure (Succinat) ..... 23,6 g
NH_4Cl ..... 10,6 g
KOH-Plätzchen ..... ca. 22,4 g
Erst Bernsteinsäure und NH_4Cl in H_2O_{bd} lösen, dann pH-Wert mit KOH-Plätzchen auf 5,8 einstellen, sterilfiltrieren

MMM-Medium (1 l)

$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ ..... 1,02 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ ..... 1,25 g
MES ..... 1,952 g
Mannit ..... ca. 85 g (550 mOsm)
pH 5,6 mit KOH einstellen, mit ultrafiltriertem H_2O auffüllen, sterilfiltrieren

Transformations-Medium (1 l)

$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ ..... 3,045 g
MES ..... 1,0 g
Mannit ..... ca. 85 g (550 mOsm)
pH 5,6 mit KOH einstellen, mit ultrafiltriertem H_2O auffüllen, sterilfiltrieren

Für die Transformation von Tabak-Chloroplasten wurden 100 µl Protoplasten-Suspension ($5 \cdot 10^6$ PP) an den Rand einer schräg gestellten Petrischale (∅ 6 cm) pipettiert. Auf die Suspension wurden 25 µl Plasmid-DNA (~50 µg, gelöst in TE pH 5,6) und 125 µl PEG-Lösung getropft und vorsichtig mit der Pipetten-Spitze vermischt. Nach 7,5 min Inkubation wurden zuerst 125 µl, nach weiteren 2 min 2,7 ml F-PCN zugegeben. Für die Einbettung in Kunststoffnetze (Filtergewebe 05-2000/51, Büttner, Wasserburg; 3x3 cm, 10x10 Maschen) wurde die Protoplasten-Suspension mit 3 ml F-Alginat vermischt, wodurch die abschließende Dichte von $8{,}5 \cdot 10^4$ PP/ml erreicht wurde. Je 625 µl der Protoplasten/Alginat-Mischung wurde auf die Kunststoffnetze aufgetropft, welche bereits vorher in Petrischalen auf Ca^{2+}-Agar gelegt worden waren (Kofer et al. 1998b, Dovzhenko et al. 1998). Nach Gelierung des Alginats (ca. 30 min) wurden die Kunststoffnetze vorsichtig vom Ca^{2+}-Agar abgelöst und in Petrischalen (∅ 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 Protoplasten zunächst über Nacht bei Dunkelheit im Kulturraum inkubiert, bevor sie bei Standard-Beleuchtung weiterkultiviert wurden. Erste Zellteilungen konnten nach 2-3 Tagen, Mikrokolonien im Teilungsstadium von 32-64 Zellen nach 7 Tagen beobachtet werden.

PEG-Lösung (40 %-ig, 26 ml)

$Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$ ..... 0,413 g
Mannit ..... 1,275 g
in ultrafiltriertem Wasser gelöst und auf 17,5 ml aufgefüllt
PEG_{1500} ..... 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
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ ..... 0,25 g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ ..... 0,204 g
Mannit ..... ca. 7,7 g (550 mOsm)
Alginat ..... 2,4 g
pH 5,8 mit KOH einstellen, mit ultrafiltriertem H_2O auffüllen, autoklavieren

Ca^{2+}-Agar (1 l)

$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$..... 2,94 g

MES ..... 1,95 g

Mannit..... ca. 85 g (550 mOsm)

pH 5,8 mit KOH einstellen, auf 1 l mit ultrafiltriertem H_2O auffüllen,

Agar ..... 10 g

autoklavieren

2.5.4 ‚Particle gun'-Transformation von Mikrokolonien

Neben dem standardmäßig zur Plastidentransformation eingesetzten Beschuss von Blätter und der PEG-Behandlung von Protoplasten wurde als neuer Ansatz der Beschuss von Mikrokolonien durchgeführt, die aus Protoplasten regeneriert und in Kunststoffnetze eingebettet worden waren. Die Isolierung der Protoplasten wurde durchgeführt wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben. Nach der Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die intakten Protoplasten in 10 ml MMM-Medium resuspendiert, gezählt, pelletiert und in einer Dichte von $1{,}7 \cdot 10^5$ PP/ml F-PCN-Medium aufgenommen. Nach Zugabe des gleichen Volumens an Alginat-Lösung wurden die Protoplasten wie oben beschrieben mit einer Dichte von $8{,}5 \cdot 10^4$ in die Kunststoffnetze eingebettet. Nach einer Kulturzeit von 6-7 Tagen in flüssigem F-PCN-Medium hatten die in Kunststoffnetze eingebetteten Protoplasten Kolonien von 32-64 Zellen gebildet. In diesem Stadium wurden die eingebetteten Mikrokolonien auf Festmedium (RMOP) transferiert und für einen Tag im Kulturraum inkubiert. Dem folgte der Beschuss mit DNA-beladenen Goldpartikeln, der wie in Abschnitt 2.5.2. beschrieben durchgeführt wurde.

2.6 Selektion plastidärer Transformanten

Für die Selektion von Plastidentransformanten nach dem ‚particle gun'-Beschuss bzw. der PEG-Behandlung wurden verschiedene Selektionsmethoden eingesetzt, die im folgenden beschrieben werden. Der homoplastomische Zustand transgener Linien wurde durch wiederholte Sprossregeneration (Zyklisieren) erreicht, in dem kleine Stücke von Blättern auf Selektionsmedium gelegt wurden, die dann wieder zu Sprossen regenerierten.

2.6.1 Selektion mit Spektinomycin/Streptomycin

Zwei Tage nach ‚particle gun'-Beschuss von Tabak-Blättern wurden diese in kleine Stücke geschnitten (3x3 mm) und auf RMOP-Medium mit 500 mg/l Spektinomycin transferiert. Nach 2 Wochen wurden die Blattstücke erneut geschnitten und auf neues Medium transferiert, ab dann im 3-wöchigen Abstand für weitere 2 Mal geschnitten und umgesetzt. Grüne Regenerate (potentielle Transformanten) wurden auf RMOP-Medium mit Spektinomycin und Streptomycin (je 250 mg/l) vereinzelt. Diese Doppelselektion dient der Unterdrückung des Wachstums von spontanen Mutanten, die aufgrund von Punktmutationen im 16S rRNA-Gen Resistenz gegen Spektinomycin aufweisen können.
PEG-behandelte Protoplasten wurden nach einer Woche Regeneration in flüssigem F-PCN-Medium für die Selektion auf RMOP-Medium mit Spektinomycin und Streptomycin (je 250 mg/l) transferiert. Der Austausch des Mediums erfolgte erstmals nach 2 Wochen, dann in Abständen von 3 Wochen für weitere 3 Mal. Grüne Regenerate wurden ebenfalls auf RMOP-Medium mit Doppelselektion (Spektinomycin/Streptomycin) vereinzelt.
Im Fall von Mikrokolonien wurde einen Tag nach Beschuss mit DNA-beladenen Goldpartikeln mit der Selektion begonnen, indem die Kunststoffnetze auf RMOP-Medium mit je 250 mg/l Spektinomycin und Streptomycin transferiert wurden. Der Austausch des Mediums und die Vereinzelung grüner Regenerate erfolgte wie für die PEG-Transformation beschrieben.

2.6.2 Selektion mit Kanamycin

Geeignete Selektionsbedingungen für eingebettete Mikrokolonien (nach PEG-Behandlung bzw. ‚particle gun'-Beschuss) wurden mit Hilfe einer Selektionsreihe bestimmt. Dabei wurden Kunststoffnetze mit eingebetteten Mikrokolonien zur Regeneration auf RMOP-Medium mit verschiedenen Kanamycin-Konzentrationen (0-100 mg/l) gelegt. Geeignete Selektionsbedingungen sind bei einer Kanamycin-Konzentration, bei der die Zellentwicklung ausreichend gehemmt ist, ohne dass die Zellteilung durch Kanamycin vollständig unterbunden wird. Entsprechend den Ergebnissen der Selektionsreihe wurden eingebettete Mikrokolonien nach einem Tag (‚particle gun'-Beschuss) bzw. einer Woche (PEG-Behandlung) zur Selektion auf RMOP-Medium mit 25 mg/l Kanamycin transferiert. Der Austausch des Selektionsmediums erfolgte erstmals nach 2 Wochen, dann in

Abständen von 3 Wochen für weitere 3 Mal. Grüne Regenerate wurden ab einer Größe von ca. 3 mm auf Kanamycin-haltiges RMOP-Medium vereinzelt.
Chloroplasten-Transformationsexperimente unter Verwendung des *aphA-6*-Gens als Selektionsmarker in Kombination mit dem Beschuss von Blättern wurden nie durchgeführt. Der Grund dafür war die Erfahrung aus zuvor durchgeführten Experimenten, in denen die Selektion Kanamycin-resistenter Regenerate aus Blattstücken nicht erfolgreich war (mündliche Mitteilung, T. Golds, ICON Genetics)

2.6.3 Kanamycin-unterstützte Photosynthese-Selektion

Für die Kombination einer Kanamycin-Selektion mit photosynthetischen Selektionsbedingungen wurden Δ*petA*-Mikrokolonien in Rekonstitutionsexperimenten anfänglich auf RMOP-Medium mit Kanamycin selektiert. Dunkelgrüne Regenerate wurden auf Antibiotika-freies RMOP-Medium, erste Sprosse dieser Regenerate auf B5-Medium transferiert, welches die Regeneration photosynthetisch aktiver Pflanzen unterstützt.

2.6.4 Mixotrophe Selektionsbedingungen

Für eine ausschließlich photosynthetische Selektion wurden beschossene Δ*petA*-Mikrokolonien auf RMOP-Medium mit reduziertem Zucker-Gehalt (0,25-1,25 % Saccharose) transferiert. Diese mixotrophen Selektionsbedingungen sollten photosynthetisch aktiven Zellen einen Regenerationsvorteil schaffen. Die beschossenen Mikrokolonien wurden für 2-3 Monate im Kulturraum selektiert, wobei die Kunststoffnetze in 3-wöchigem Abstand auf neues RMOP-Medium mit reduziertem Zuckergehalt transferiert wurden.

2.7 Analyse potentieller Plastidentransformanten

2.7.1 Allgemeine Methoden

Wie die Methoden zur Herstellung rekombinanter Plasmide lehnten sich auch die analytischen Techniken weitgehend an übliche Standardprotokolle (Sambrook et al. 1989,

Ausubel et al. 1999) bzw. die Herstellerprotokolle molekularbiologischer ‚kits' an. Im Folgenden sind die verwendeten Methoden detailliert beschrieben.

2.7.2 Isolierung von DNA aus Tabakpflanzen

Die Präparation von DNA aus Kallusgewebe und Blattmaterial wurde unter Verwendung eines Lysispuffers und darauffolgender Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. 50-100 mg Kallusgewebe oder Blattmaterial wurden in 350 µl Lysispuffer, 1 µl Antischaum (Reagent DX, Qiagen, Hilden) und 2 µl RNase A (10 mg/ml) in der „Mixer Mill MM 300" (Retsch, Haan) unter Zuhilfenahme eines Wolfram-Kügelchens (∅ 3 mm, Qiagen, Hilden) homogenisiert (2 min, 25 Oszillierungen/sec). Nach Zugabe von weiteren 350 µl Lysispuffer wurden die Proben für 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Zur Aufreinigung der DNA wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Das mit Isopropanol gefällte DNA-Pellet wurde einmal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in 50-100 µl RNase-haltigem TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen. Die auf diesem Weg gewonnene DNA konnte direkt für PCR-Analysen verwendet werden. Größere Mengen DNA für die Southern-Analyse wurden aus ca. 200 mg Kallusgewebe oder Blattmaterial isoliert. Um die Reinheit der isolierten DNA zu gewähren, wurde die Phenol/Chloroform-Extraktion zweifach durchgeführt.
In einigen Fällen wurde DNA aus Kallusgewebe und Blattmaterial mit Hilfe des ‚DNeasy Plant Mini Kit'-Systems der Firma Qiagen in hohem Reinheitsgrad isoliert. Hierfür wurden 100-200 mg pflanzliches Gewebe nach Angaben des Herstellers homogenisiert und die DNA über eine Säule gereinigt.

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_2O_{bd} lösen, autoklavieren; Lagerung bei 4°C oder -20°C

2.7.3 PCR-Analyse

Erste Analysen von grünen Regeneraten wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung geeigneter Primer durchgeführt. Dabei wurde zum einen eine Amplifikation zum Nachweis des Markergens durchgeführt. Bei dafür positiven Linien wurde die Integration des Markergens an der erwarteten Plastom-Insertionsstelle mit Hilfe eines Marker-internen Primers und eines zweiten Primers, der außerhalb der Flanken zur homologen Rekombination im Plastom bindet, nachgewiesen. Standard-PCR-Ansätze und Temperaturprofile wurden ausgeführt wie in 2.4.3 beschrieben.

2.7.4 Southern-Analyse

Für die Southern-Analyse wurden 3 µg Gesamt-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und auf einem 0,8 %-igem Agarosegel bei 20-40 V für 14-20 h aufgetrennt. Für einen erleichterten Transfer vor allem großer DNA-Fragmente auf die Hybond N+- Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde das Gel für 20 min in 0,25 M HCl geschwenkt (Depurinierung). Unter Verwendung 0,4 M NaOH-Lösung als Transfermedium wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe der Kapillarblotmethode auf die Nylon-Membran übertragen. Die Fixierung der DNA an die Membran wurde durch Backen (Crosslinken) bei 80°C im Hybridisierungsofen (2 h) durchgeführt. Für die nicht radioaktive Hybridisierung und Detektion wurde das Digoxigenin-System der Firma Roche (Mannheim) unter Verwendung des ‚DIG DNA labeling and detection kit' eingesetzt. Dabei wurden alle Schritte entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die immunologische Detektion wurde ein Chemolumineszenz-Substrat (CSPD, Roche) in Kombination mit der alkalischen Phosphatase verwendet. Die Signale wurden durch Belichtung eines X-OMAT LS-Films (Kodak) für 0,5-15 h visualisiert.

Die Sonden für die Hybridisierung wurden mit Hilfe des ‚PCR DIG probe synthesis kit' (Roche, Mannheim) hergestellt. Für Sonde P1 wurde die linke Flanke von Vektor pICF558 mit Hilfe der Primer o13/o14 amplifiziert (1000 bp, siehe Abb. 2.1), für Sonde P2 ein Teil der rechten Flanke von Vektor pICF596 mit Hilfe der Primer o71/o111 (300 bp, siehe Abb. 3.1), für Sonde P3 die rechte Flanke von Vektor pICF597 unter Verwendung der Primer

o15/o16 (1000 bp, siehe Abb. 3.7). Die Sonden wurden mit Hilfe des ‚PCR Purification Kit' (Qiagen, Hilden) für die Hybridisierung gereinigt.

2.7.5 Expressionsstudien des *aphA-6*-Gens

Um die Expression des *aphA-6*-Gens in Abhängigkeit der Regelelemente in verschiedenen transgenen Linien vergleichen zu können, wurden kreisförmige Blattstücke homoplastomischer Linien auf RMOP-Medium mit verschiedenen Kanamycin-Konzentrationen (0-200 mg/l) platziert. Die Fähigkeit zur Regeneration wurde nach 4 Wochen Inkubation im Kulturraum ausgewertet.

2.7.6 Expressionsnachweis des *uidA*-Gens

Im histologischen Nachweis des GUS-Proteins kann die Expression des *uidA*-Gens in transplastomen Tabaklinien direkt unter Verwendung des Farbstoffs X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Glucuronid) nachgewiesen werden. Bei der von Jefferson et al. (1985) und Fütterer (1995) beschriebenen Methode wird der Farbstoff X-Gluc durch das GUS-Protein in Glucuronat und 5-Brom-4-Chlor-Indolyl gespalten. Letzteres dimerisiert oxidativ zu einem blauen Indigoderivat (5,5'-Dibromo-4,4'-Dichlor-Indigo).

X-Gluc-Färbelösung

Phosphatpuffer (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4), pH 7,0 ..... 100 mM
EDTA..... 1 mM
Kaliumhexacyanoferrat(II) ..... 1 mM
Kaliumhexacyanoferrat(III)..... 1 mM
Triton X-100 ..... 0,3 %
X-Gluc (in DMF)..... 1 mM
Lagerung für kurze Zeit bei -20°C

Für die histologische GUS-Färbung wurden Blätter oder 2-3 Wochen alte Keimlinge in X-Gluc-Färbelösung gelegt und bei 37°C für 6-16 h inkubiert. Um die blaue Färbung besser sichtbar zu machen, wurde das Chlorophyll mit 70 %-igem Ethanol aus den Blättern extrahiert.

2.7.7 Detektion starker Chlorophyll-Fluoreszenz

Für die optische Detektion starker Chlorophyll-Fluoreszenz (‚high chlorophyll fluorescence', HCF) in Δ*petA*-Linien wurden Keimlinge mit Lichtblitzen der Wellenlänge 690 nm bestrahlt und die Fluoreszenz mit Hilfe der FluoroCam 690MF (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic) photographiert.

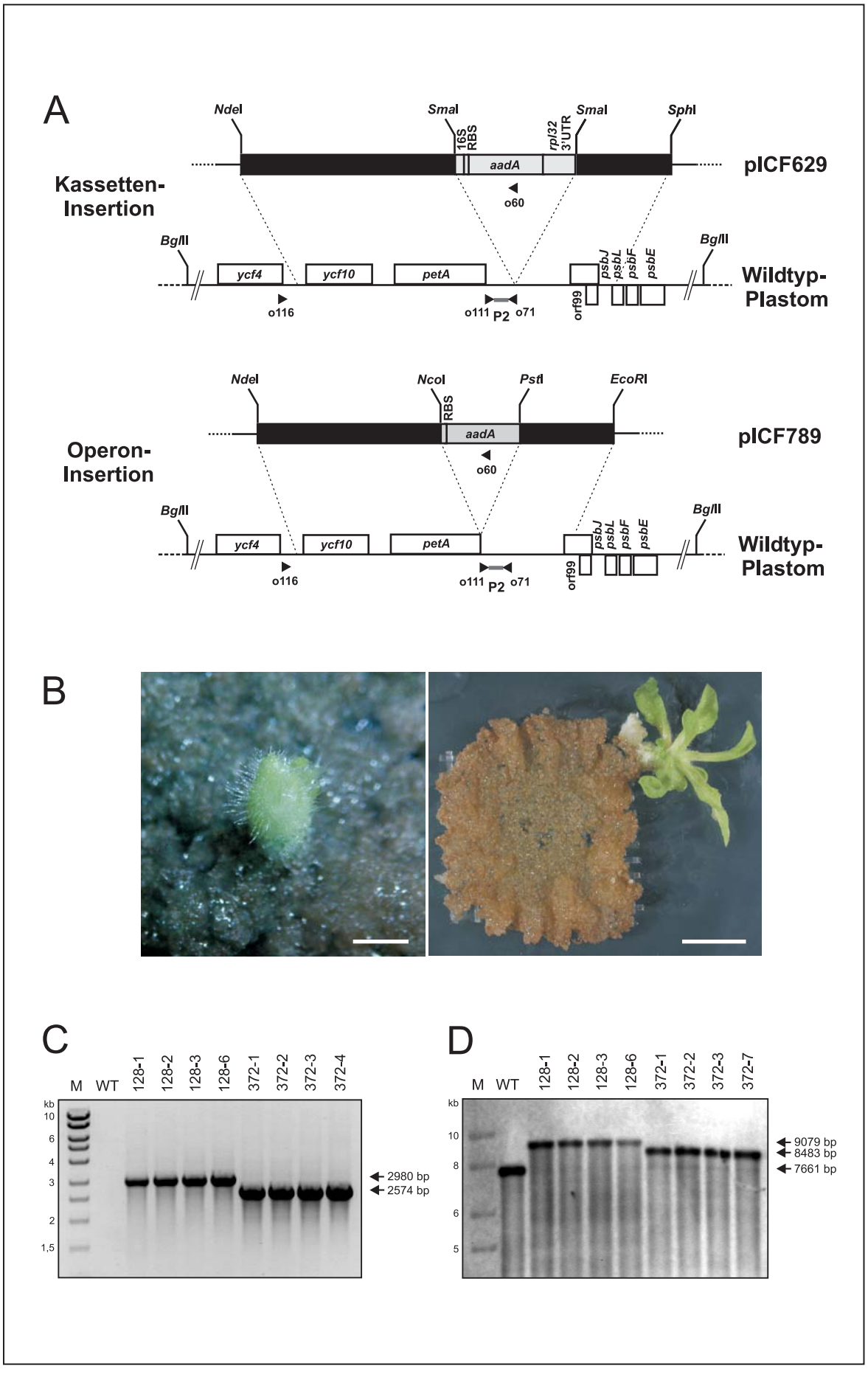
3 Ergebnisse

3.1 Mikrokolonien als Zielgewebe für die Plastidentransformation

3.1.1 ‚Particle gun'-Beschuss von Mikrokolonien

Aus Tabak-Protoplasten regenerierte und in Plastiknetze eingebettete Mikrokolonien wurden in verschiedenen Experimenten zur Plastidentransformation mit Hilfe der ‚particle gun'-Methode eingesetzt. Dabei wurde anfangs das *aadA*-Gen als Marker in Kombination mit einer Doppelselektion aus Spektinomycin und Streptomycin verwendet. Als optimale Vorgehensweise für die Plastidentransformation unter Verwendung von Mikrokolonien als Zielgewebe erwies sich wie folgt: Eingebettete Protoplasten wurden für sieben Tage in Flüssigmedium kultiviert, bevor die Netze einen Tag auf Festmedium (RMOP) gelegt wurden. Daraufhin erfolgte der Beschuss mit DNA-beladenen Goldpartikeln unter Verwendung standardisierter ‚particle gun'-Parameter (siehe Abschnitt 2.5.2). Ein Tag später wurden die Netze zur Selektion auf Antibiotika-haltiges RMOP-Medium (500 mg/l Spektinomycin) transferiert. Entscheidend für den Transformationserfolg waren eine hohe Plattierungsdichte der in die Netze eingebetteten Protoplasten und der Entwicklungszustand der Mikrokolonien (Koloniegröße von 32-64 Zellen) am Tag der Transformation. Erstmals nach 2 Wochen, ab dann in 3-wöchigem Abstand, wurden die Netze auf neues Selektionsmedium mit Spektinomycin und Streptomycin (je 250 mg/l) transferiert. Erste grüne Regenerate erschienen auf den Netzen nach ca. 3 Wochen, spätere nach bis zu 12 Wochen Selektion (Abb. 3.1B). Alle Regenerate wurden ab einer Größe von etwa 3 mm Durchmesser von den Plastiknetzen heruntergenommen und direkt auf Selektionsmedium gesetzt. Vereinzelte Regenerate, die unter Selektion eine normale Sprossentwicklung zeigten und weiterhin einen grünen Phänotyp aufwiesen, wurden zur Analyse herangezogen.

Mit dieser Vorgehensweise konnte die neutrale Integration des *aadA*-Gens ‚downstream' zum *petA*-Gen als Expressionskassette oder Operoninsertion (Vektoren pICF629 und pICF789, Abb. 3.1A) erreicht werden. Bei der Insertion von Expressionskassetten wurden neben der kodierenden Region des Selektionsmarkers zusätzlich noch 5' und 3' regulierende Elemente (Promotor, 5'UTR oder ribosomale Bindestelle, 3'UTR) in das


A
NdeI
SmaI
16S RBS
rpl32 3'UTR
SmaI
SphI
aadA
pICF629
Kassetten-Insertion
o60
BglII
ycf4
ycf10
petA
psbJ
psbL
psbF
psbE
BglII
Wildtyp-Plastom
o116
o111
P2
o71
orf99
NdeI
NcoI
PstI
EcoRI
RBS
aadA
pICF789
Operon-Insertion
o60
BglII
ycf4
ycf10
petA
psbJ
psbL
psbF
psbE
BglII
Wildtyp-Plastom
o116
o111
P2
o71
orf99
B
C
M
WT
128-1
128-2
128-3
128-6
372-1
372-2
372-3
372-4
kb
10
6
4
3
2
1,5
2980 bp
2574 bp
D
M
WT
128-1
128-2
128-3
128-6
372-1
372-2
372-3
372-7
kb
10
8
6
5
9079 bp
8483 bp
7661 bp

Plastom integriert, welche die Expression des Markergens steuern. Im Fall der Operoninsertion wurde nur die kodierende Region des Markergens zusammen mit einer Ribosomenbindestelle (RSB) in das plastidäre Genom inseriert. Dabei ist der richtige Insertionsort von Bedeutung, damit die Expression des *aadA*-Gens durch endogene Regelelemente gesteuert werden kann. ‚Upstream' zum *psaI*-Operon (*psaI-ycf4-ycf10-petA*) liegende Sequenzen dienten dabei als Promoter für die Expression des ‚downstream' zum *petA*-Gen inserierten *aadA*-Gens. Endogene Plastomsequenzen ‚downstream' zu dem neuen Operon *psaI-ycf4-ycf10-petA-aadA* dienten als 3'UTR zur Stabilisierung der mRNA und korrekten Translation der einzelnen Gene.

Tab. 3.1 Chloroplasten-Transformation: neutrale *aadA*-Insertion

Experiment #	Vektor	Anzahl Netze	Analyse *	Effizienz **
T128	pICF629	7	7/8	7/7
T134	pICF629	8	0/0	0/8
T372	pICF789	8	5/8	5/8

* Transformanten/Regenerate, ** Transformanten/Netz

In Tabelle 3.1 sind alle Experimente zur neutralen Insertion des *aadA*-Gens aufgelistet, die unter Verwendung dieser neuen Methode durchgeführt wurden. Auch für die Deletion und Rekonstitution des *petA*-Gens (siehe Abschnitt 3.3) kam die neu etablierte Methode zur Transformation des plastidären Genoms zum Einsatz.

Abbildung 3.1 Verwendung von Mikrokolonien als Zielgewebe für die Plastidentransformation. A Schematische Darstellung der Vektor-Konstruktion und Plastom-Insertion des *aadA*-Gens (Kassetteninsertion, pICF629, und Operoninsertion, pICF789). Die für die Klonierung und Southern-Analyse wichtigen Restriktionsschnittstellen sind angezeigt, sowie die Primer-Bindestellen für PCR-Analyse (Marker-Integration ins Plastom) und Sonden-Herstellung (P2). **B** Potentielle Plastidentransformanten erschienen nach 4 Wochen (links) bzw. 7 Wochen (rechts) als grüne, Spektinomycin/Streptomycin-resistente Regenerate. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm bzw. 1 cm. **C** PCR-Analyse potentieller Plastidentransformanten unter Verwendung eines *aadA*-spezifischen Primers (o60) und eines Primers, der außerhalb der linken Flanke bindet (o116). Die Insertion der *aadA*-Expressionskassette ‚downstream' zum *petA*-Gen ergab ein PCR-Fragment von 2980 bp (Linien T128), wohingegen die Insertion der kodierenden Region des *aadA*-Gens direkt hinter das *petA*-Gen ein Fragment von 2574 bp lieferte (Linien T372). Die Wildtyp-Kontrolle (WT) lieferte kein PCR-Produkt. M, Größenmarker (MassRuler). **D** Southern-Analyse PCR-positiver Linien unter Verwendung des Restriktionsenzyms *Bgl*II für den Verdau und der Sonde P2 für die spezifische Hybridisierung. Die Wildtyp-Kontrolle (WT) lieferte ein Fragment von 7661 bp, wohingegen plastidäre Transformanten sich durch Fragmente von 9079 bp (Kassetteninsertion, Linien T128) bzw. 8483 bp (Operoninsertion, Linien T372) auszeichneten. M, Größenmarker (MassRuler).

3.1.2 Analyse Spektinomycin-resistenter Regenerate

Für die Analyse Spektinomycin-resistenter Regenerate aus Mikrokolonie-Beschuss-Experimenten wurde Gesamt-DNA isoliert, und mit Hilfe von PCR und Southern-Analyse die korrekte Insertion des *aadA*-Gens nachgewiesen. Unter Verwendung der Primer o59/o60 wurde in einem ersten Test das Vorhandensein des *aadA*-Gens nachgewiesen, was sich durch ein PCR-Produkt von 478 bp bestätigte. Positive Linien wurden dann auf die richtige Integration des Markergens im Plastom hin untersucht, wobei hier ein interner Primer (o60) verwendet wurde in Kombination mit einem Primer, der außerhalb der linken Flanke bindet (o116). Die korrekte Integration des *aadA*-Gens resultierte in einem PCR-Fragment von 2980 bp für die Integration der Expressionskassette (Transformanten T128) und 2574 bp für die Operoninsertion (Transformanten T372, Abb. 3.1C).
Die darauffolgende Southern-Analyse diente zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse und sollte Aufschluss über das Verhältnis von transgenen zu Wildtyp-Plastomkopien geben. Dafür wurde Gesamt-DNA mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II geschnitten und mit Sonde P1 hybridisiert, welche sowohl an transgenes als auch Wildtyp-Plastom bindet (siehe Abb. 3.1A). Die hybridisierte Wildtyp-Kontrolle zeigte ein Fragmentgröße von 7661 bp, wohingegen alle transplastomen Linien die erwarteten Fragmentgrößen von 9079 bp (Kassetteninsertion, Linien T128) bzw. 8483 bp (Operoninsertion, Linien T372) zeigten (Abb. 3.1D). Alle getesteten Linien waren homoplastomisch oder nahezu homoplastomisch bezüglich der neutralen Insertion des *aadA*-Gens ins plastidäre Genom.

3.2 Etablierung des *aphA-6*-Gens als plastidärer Marker

3.2.1 Klonierung von Vektoren mit dem *aphA-6*-Gen als Marker

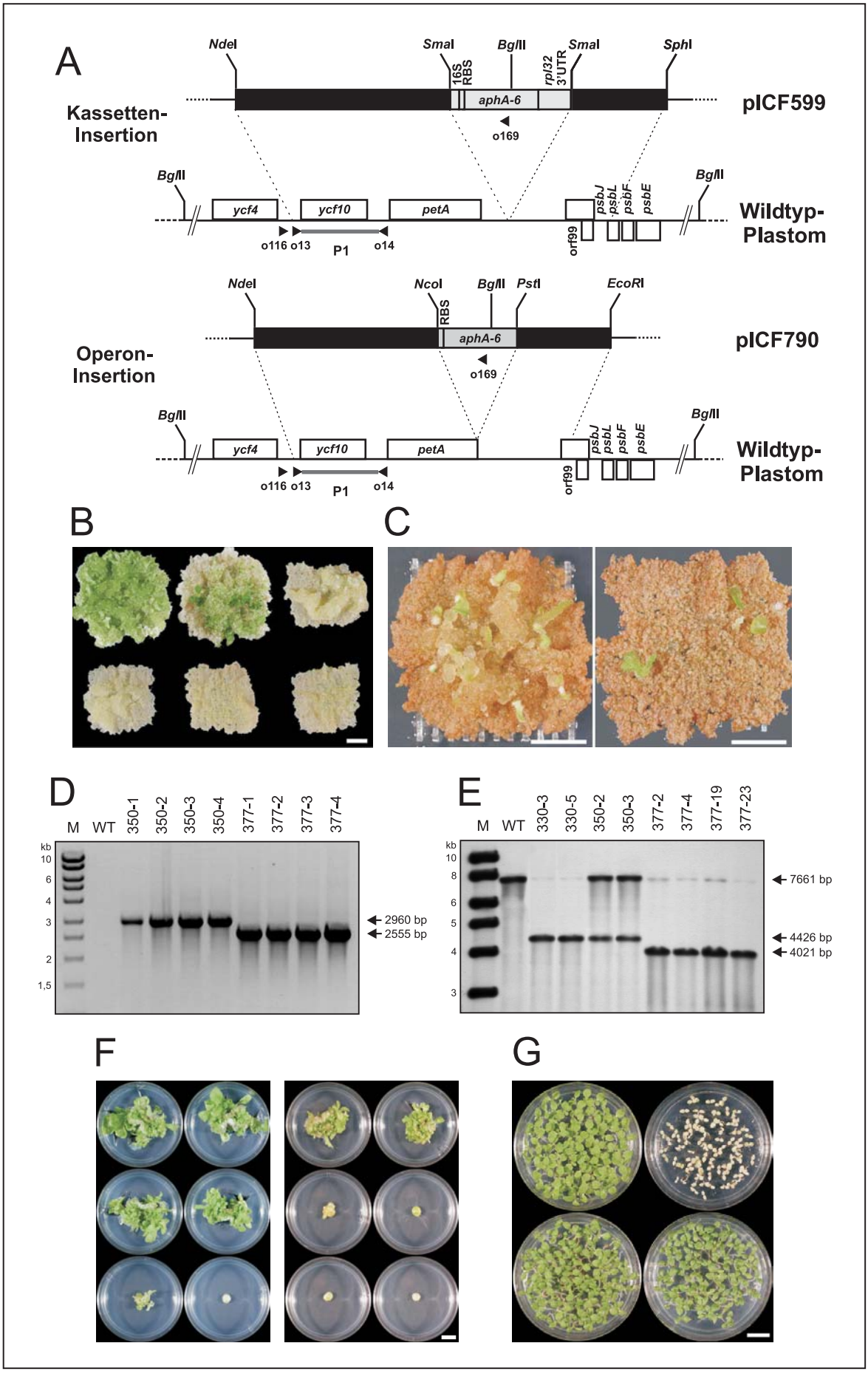
Für die neutrale Integration des *aphA-6*-Gens als Marker in das plastidäre Genom wurden zwei Vektoren kloniert, einmal zur Insertion einer Expressionskassette (pICF599) und einmal zur Operoninsertion (pICF790), wie in Abbildung 3.2A schematisch gezeigt.

3.2.2 Bestimmung der Kanamycin-Selektionsbedingungen

Zur Bestimmung einer geeigneten Kanamycinkonzentration für die Selektion plastidärer Transformanten wurden aus Protoplasten regenerierte, eingebettete Mikrokolonien auf RMOP-Medium mit unterschiedlichen Kanamycin-Konzentrationen (0-100 mg/l) gelegt und für 4 Wochen zur Regeneration inkubiert. Konzentrationen von 10 mg/l waren nicht ausreichend zur Unterdrückung der Sprossbildung, wohingegen Konzentrationen von mehr als 50 mg/l die Regeneration der Mikrokolonien zu stark inhibierte (Abb. 3.2B). Aus diesen Gründen wurde eine Konzentration von 25 mg/l für die routinemäßige Selektion Kanamycin-resistenter Transformanten verwendet. Aus späteren Experimenten wurde die Erkenntnis gewonnen, dass ein Selektionslevel von 50 mg/l Kanamycin gut geeignet ist, wenn das *aphA-6*-Gen unter der Kontrolle des starken 16S rRNA-Promotors steht.

3.2.3 Selektion Kanamycin-resistenter Regenerate

Als Transformationsmethoden kamen der ‚particle gun'-Beschuss eingebetteter Mikrokolonien und die PEG-Behandlung von Protoplasten zum Einsatz. Protoplasten wurden wie in 3.1.1 beschrieben eine Woche nach Isolation und Einbettung auf Festmedium (RMOP) transferiert und einen Tag danach beschossen. Zwei Tage nach der Transformation wurden die Netze zur Selektion auf Kanamycin-haltiges Medium (25 mg/l) umgesetzt. Ähnlich wie unter Spektinomycin-Selektion erschienen erste Kanamycin-resistente Regenerate nach etwa 3-4 Wochen, die letzten nach 12-14 Wochen. Kritisch für die Selektion plastidärer Transformanten ist das Herunternehmen grüner Kanamycin-resistenter Regenerate von den Netzen und die Vereinzelung auf Kanamycin-haltiges RMOP-Medium. Dieser selektive Zwischenschritt der Vereinzelung ist notwendig, da bei einer Konzentration von 25 mg/l Kanamycin häufig eine größere Anzahl von Sprossen regeneriert, die aber nicht alle transformiert sind (nicht stringente Selektion, Abb. 3.2C). In späteren Transformationsexperimenten (T350 und T376) wurde die Kanamycin-Konzentration für die Selektion auf 50 mg/l erhöht, nachdem bekannt war, dass die Expression des *aphA-6*-Gens unter Kontrolle des 16S rRNA-Promotors die Kanamycinresistenz erhöht (siehe 3.2.4). Unter diesen Selektionsbedingungen war die Anzahl regenerierender Kalli und Sprosse signifikant geringer und demzufolge der Prozentsatz an transformierten Regeneraten höher (stringente Selektion, Abb. 3.2.C).


A
Kassetten-Insertion
NdeI
SmaI
BglII
SmaI
SphI
16S RBS
rpl32 3'UTR
aphA-6
o169
pICF599
BglII
ycf4
ycf10
petA
psbJ
psbL
psbF
psbE
orf99
BglII
o116 o13
P1
o14
Wildtyp-Plastom
Operon-Insertion
NdeI
NcoI
BglII
PstI
EcoRI
RBS
aphA-6
o169
pICF790
BglII
ycf4
ycf10
petA
psbJ
psbL
psbF
psbE
orf99
BglII
o116 o13
P1
o14
Wildtyp-Plastom
B
C
D
M WT 350-1 350-2 350-3 350-4 377-1 377-2 377-3 377-4
kb
10
6
4
3
2
1,5
2960 bp
2555 bp
E
M WT 330-3 330-5 350-2 350-3 377-2 377-4 377-19 377-23
kb
10
8
6
5
4
3
7661 bp
4426 bp
4021 bp
F
G

Tab. 3.2 Chloroplasten-Transformation: neutrale *aphA-6*-Insertion

Experiment #	Vektor	Methode (Anzahl Netze)	Analyse *	Effizienz **
T186	pICF599	Mikrokolonie-Beschuss (7)	0/2	0/7
T330	pICF599	PEG-Behandlung (9)	4/5	4/9
T350	pICF599	Mikrokolonie-Beschuss (6)	6/6	6/6
T376	pICF599	PEG-Behandlung (9)	9/12	9/9
T377	pICF790	PEG-Behandlung (9)	9/9	9/9

* Transformanten/Regenerate, ** Transformanten/Netz

Kanamycin-resistente Regenerate zeigten nach der Vereinzelung eine normale Regeneration, wohingegen nicht transformierte Regenerate schnell ausblichen. Auf diese Weise konnte schon auf Ebene der Regenerate mit hoher Wahrscheinlichkeit vorausgesagt werden, welche Linien transformiert waren und das *aphA-6*-Gen ins plastidäre Genom integriert hatten.

Abbildung 3.2 Verwendung des *aphA-6*-Gens als plastidärer Marker. A Schematische Darstellung der Vektor-Konstruktion und Plastom-Insertion des *aphA-6*-Gens (Kassetteninsertion, pICF599, und Operoninsertion, pICF790). Die für die Klonierung und Southern-Analyse wichtigen Restriktionsschnittstellen sind angezeigt sowie die Primer-Bindestellen für PCR-Analyse (Marker-Integration ins Plastom) und Sonden-Herstellung (P1). **B** Bestimmung der geeigneten Kanamycin-Konzentration für die Selektion plastidärer Transformanten. Eingebettete Mikrokolonien auf 0, 5 und 10 mg/l Kanamycin (oberer Reihe) bzw. 25, 50 und 100 mg/l Kanamycin (untere Reihe) nach 4 Wochen Regeneration. **C** Nicht stringente Selektion (5 Wochen auf 25 mg/l Kanamycin) führte zu einer großen Anzahl grüner Regenerate, vor allem in der Mitte der Netze (links). Stringente Selektion (5 Wochen auf 50 mg/l Kanamycin) führte zu einer geringen Anzahl grüner, Kanamycin-resistenter Regenerate (rechts). **D** PCR-Analyse potentieller Plastidentransformanten unter Verwendung eines *aphA-6*-internen Primers (o169) und eines Primers, der außerhalb der linken Flanke bindet (o116). Die Insertion der *aphA-6*-Expressionskassette ‚downstream' zum *petA*-Gen ergab ein PCR-Fragment von 2960 bp (Linien T350), wohingegen die Operoninsertion des *aphA-6*-Gens direkt hinter der kodierenden Region des *petA*-Gens nur ein Fragment von 2555 bp lieferte (Linien T377). Die Wildtyp-Kontrolle (WT) lieferte kein PCR-Produkt. M, Größenmarker (MassRuler). **E** Southern-Analyse PCR-positiver Linien unter Verwendung des Restriktionsenzyms *Bgl*II für den Verdau und der Sonde P1 für die spezifische Hybridisierung. Die Wildtyp-Kontrolle (WT) lieferte ein Fragment von 7661 bp, wohingegen plastidäre *aphA-6*-Transformanten sich durch Fragmente von 4426 bp (Kassetteninsertion, Linien T330/T350) bzw. 4021 bp (Operoninsertion, Linien T377) auszeichneten. M, Größenmarker (MassRuler). **F** Regenerationsfähigkeit runder Blattstücke verschiedener *aphA-6*-Transformanten (Kassetteninsertion, linker Block, und Operoninsertion, rechter Block) auf 0, 10, 25, 50, 100 und 200 mg/l Kanamycin (oben rechts nach untern links je Block). **G** T1-Keimlinge von Wildtyp-Samen (obere Reihe) und Samen einer plastidären *aphA-6*-Transformante (T330-3, untere Reihe) auf 0 und 200 mg/l Kanamycin nach 3 Wochen Keimzeit. Der Maßstabsbalken in **B**, **C**, **F** und **G** entspricht jeweils 1 cm.

In PEG-Transformationsexperimenten unter Verwendung des *aphA-6*-Gens als Marker wurde immer mit einer Konzentration von 25 mg/l Kanamycin selektiert. Zum Zeitpunkt des Selektionsbeginns (7 Tage nach der Transformation) waren die Zellteilungen PEG-behandelter Protoplasten noch nicht so weit vorangeschritten wie im Vergleich zum Selektionsstart bei beschossenen Mikrokolonien (9 Tage nach der Einbettung). Aus diesem Grund war eine Konzentration von 25 mg/l ausreichend, um die Sprossregeneration nicht transformierter Zellen ausreichend zu unterdrücken. Tabelle 3.2 fasst alle Daten zur neutralen Insertion des *aphA-6*-Gens zusammen, die aus Experimenten von beschossenen Mikrokolonien oder PEG-behandelten Protoplasten stammten.

3.2.4 Analyse Kanamycin-resistenter Regenerate

Von den vereinzelten Regeneraten, die einen grünen Phänotyp und eine normale Sprossbildung zeigten, wurde DNA isoliert, um diese auf die Integration des *aphA-6*-Gens in das plastidäre Genom zu analysieren. Mit Hilfe der PCR wurde in einem ersten Test unter Verwendung zweier *aphA-6*-interner Primer (o168/o169) das Vorhandensein des Markergens nachgewiesen, was sich durch ein PCR-Produkt von 479 bp zeigte. Positive Linien wurden dann auf die korrekte Integration des *aphA-6*-Gens in das Plastom untersucht, indem ein interner Primer (o169) verwendet wurde und ein Primer, der außerhalb der linken Flanke bindet (o116). Die korrekte Integration resultierte in einem PCR-Fragment von 2960 bp für die Insertion der Expressionskassette (Transformanten T350) und von 2555 bp für Operoninsertion (Transformanten T377, Abb. 3.2D).
Die darauffolgende Southern-Analyse diente zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse und sollte Aufschluss über das Verhältnis transgener zu Wildtyp-Plastomkopien geben. Dafür wurde die DNA PCR-positiver Linien mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II geschnitten und Sonde P1 (siehe Abb. 3.2A) für die Hybridisierung verwendet, welche sowohl an transgenes als auch an Wildtyp-Plastom bindet. Die hybridisierte Wildtyp-Kontrolle lieferte ein Fragment von 7661 bp, wohingegen alle transplastomen Linien die erwarteten Fragmente von 4426 bp (Kassetteninsertion, Linien T330/T350) bzw. 4021 bp (Operoninsertion, Linien T377) aufwiesen (Abb. 3.2E). Die getesteten Linien zeigten neben restringierten transgenen Plastommolekülen auch jeweils noch Reste von Wildtyp-Plastommolekülen auf, was mit der geringen Anzahl an durchgeführten Regenerationszyklen (1-2) erklärbar ist.

3.2.5 Expression des *aphA-6*-Gens in Plastidentransformanten

Für die Bestimmung der Kanamycintoleranz verschiedener *aphA-6*-Transformanten (Kassetten- bzw. Operoninsertion) wurden runde Blattstücke auf RMOP-Medium mit unterschiedlichen Kanamycin-Konzentrationen gelegt (0-200 mg/l). Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass die Expression des *aphA-6*-Gens unter Kontrolle des starken 16S rRNA-Promotors transplastomen Linien eine höhere Kanamycintoleranz verleiht, als wenn das *aphA-6*-Gen als Operoninsertion direkt ‚downstream' zur kodierenden Sequenz des *petA*-Gens integriert wurde und dadurch unter der Kontrolle endogener Regelelemente steht. Blattstücke der homoplastomischen Transformante 330-3 (Kassetteninsertion) zeigten eine mit der Nullkontrolle vergleichbare Regeneration bis zu einer Kanamycin-Konzentration von 50 mg/l. Bei einer Konzentration von 100 mg/l war nur noch geringe Kallusbildung zu beobachten, höhere Konzentrationen führten zum Absterben des Blattgewebes (Abb. 3.2F, linker Block). Die Regeneration von Blattstücken der Transformante T377-4 (Operoninsertion) war maximal bis zu einer Konzentration von 25 mg/l Kanamycin möglich. Eine mit der Nullkontrolle vergleichbare Regeneration war nur bis 10 mg/l vorhanden, wohingegen Konzentrationen von 100 mg/l und mehr zum Absterben des Gewebes führten (Abb. 3.2F, rechter Block).

3.2.6 Analyse der Nachkommen (T1)

Transplastome Linien wurden nach mehreren *in vitro*-Regenerationszyklen auf Kanamycin-haltigem RMOP-Medium für die Samenproduktion ins Gewächshaus transferiert. Um die Vererbung des *aphA-6*-Gens an die nächste Generation (T1) zu überprüfen, wurden Samen einer selbstbestäubten Transformante (T330-3) und einer Wildtyp-Kontrolle zur Keimung auf B5-Medium ohne und mit Kanamycin (200 mg/l) gelegt. Die Samen der Wildtyp-Kontrolle und der *aphA-6*-Transformante zeigten auf Medium ohne Kanamycin eine vergleichbare Keimfähigkeit. Auf Kanamycin-haltigem Medium wiesen nur die transplastomen Keimlinge Resistenz und somit einen grünen Phänotyp auf, während alle Wildtyp-Keimlinge ausblichen (Abb. 3.2G). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass das *aphA-6*-Gen an alle Nachkommen dieser plastidären Transformante weitervererbt worden war.

3.3 Deletion und Rekonstitution eines plastidären Gens

3.3.1 Deletion des *petA*-Gens

Für die Deletion des *petA*-Gens wurden zwei verschiedene Vektoren verwendet. Zum einen wurde die kodierende Region des *petA*-Gens und 300 bp ‚downstream' dazu durch die Integration einer *aadA*-Expressionskassette entfernt. Im zweiten Beispiel wurde die kodierende Sequenz des *petA*-Gens direkt durch die des *aadA*-Gens ersetzt (siehe Abb. 2.1, Seite 24/25). Als Methoden für die Transformation kam sowohl der ‚particle gun'-Beschuss von Blättern als auch von eingebetteten Mikrokolonien zum Einsatz. Tabelle 3.3 fasst alle Transformationsexperimente zur Deletion des *petA*-Gens und deren Ergebnisse zusammen. Spektinomycin-resistente Regenerate wurden mit Hilfe von PCR- und Southern-Analyse auf die korrekte *petA*-Deletion/*aadA*-Integration analysiert. Unter Zuhilfenahme mehrere Zyklisierungsschritte wurde der homoplastomische Zustand *petA*-defizienter Linien erreicht.

Tab. 3.3 Chloroplasten-Transformation: *petA*-Deletion

Experiment #	Vektor	Zielgewebe (Anzahl Beschießungen)	Analyse *
T9	pICF558	Blätter (6)	10/29
T10	pICF558	Blätter (10)	3/12
T65	pICF558	Mikrokolonien (8)	31/38
T91	pICF596	Mikrokolonien (6)	1/2
T127	pICF558	Mikrokolonien (7)	2/2
T144	pICF558	Mikrokolonien (6)	4/11
T339	pICF558	Mikrokolonien (8)	2/2

* Transformanten/grüne Regenerate

Für erste PCR-Analysen zum Nachweis des *aadA*-Gens wurde Gesamt-DNA Spektinomycin-resistenter Regenerate als ‚template' eingesetzt und die Primerkombination o59/o60 verwendet. Linien, bei denen das *aadA*-Gen nachgewiesen werden konnte, zeichneten sich durch ein PCR-Fragment von 478 bp aus. Die korrekte Integration des Markergens ins plastidäre Genom und die damit verbundene Deletion des *petA*-Gens konnte unter Verwendung der Primer o116/o60 gezeigt werden und resultierte in Fragmenten von 1716 bp (Kassetteninsertion, Linien T9 und T10) bzw. 1590 bp

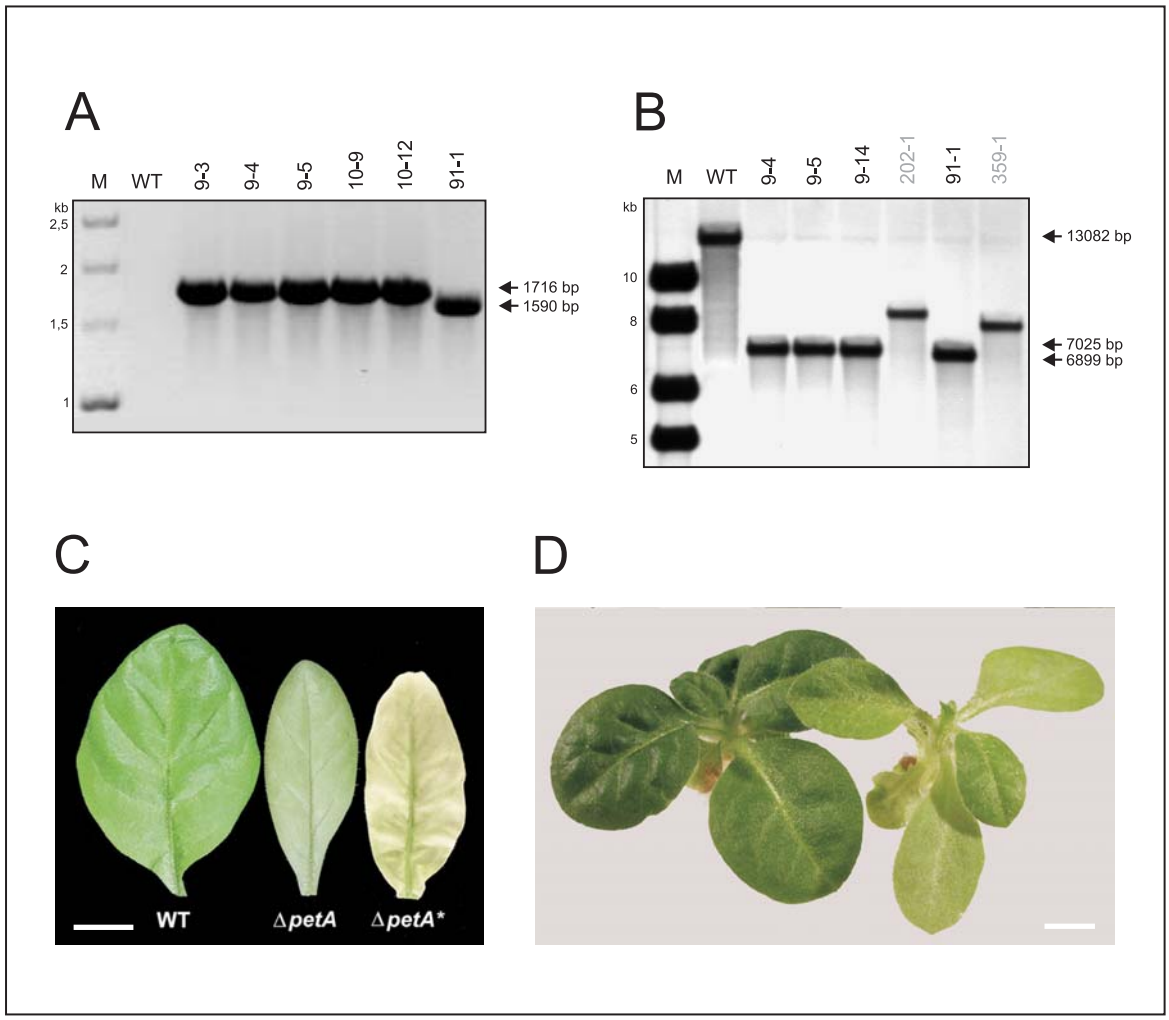


Abbildung 3.3 Deletion des plastidären *petA*-Gens. Für die Vektorkonstruktionen, Primer-Bindestellen, Restriktionsschnittstellen und Sonden-Bindestelle siehe Abbildung 2.1 **A** PCR-Analyse potentieller *petA*-Deletionsmutanten unter Verwendung eines Marker-spezifischen Primers (o60) und eines Primers, der außerhalb der linken Flanke bindet (o116). Die Deletion des *petA*-Gens und 300 bp der ‚downstream'-Region durch die Insertion der *aadA*-Expressionskassette lieferte ein PCR-Produkt von 1716 bp (Linien T9 und T10), die Deletion des *petA*-Gens durch den Austausch der kodierenden Sequenzen von *petA*- und *aadA*-Gen resultierte in einem Produkt von 1590 bp (Linie T91). Die Wildtyp-Kontrolle (WT) lieferte kein PCR-Produkt. **B** Southern-Analyse *petA*-deletierter Linien unter Verwendung des Restriktionsenzyms *Nco*I für den Verdau und der Sonde P1 für die spezifische Hybridisierung. Die Wildtyp-Kontrolle lieferte ein Fragment von 13082 bp, *petA*-deletierte Linien zeichneten sich durch Fragmente von 7025 bp (Kassetteninsertion, Linien T9) bzw. 6899 bp (Operoninsertion, Linie T91) aus. (Bezüglich der beiden *petA*-rekonstituierten Linien, T202-1 und T359-1, siehe Abb. 3.5). **C** Phänotypischer Vergleich der Blätter einer Tabak Wildtyp-Pflanze (WT) und zweier homoplastomischer *petA*-defizienter Mutanten herangewachsen unter Schwachlichtbedingungen (Δ*petA*) bzw. bei Standardbeleuchtung (Δ*petA**). **D** Tabak Wildtype-Pflanze (links) und eine Δ*petA*-Mutante (rechts) auf MS-Medium herangezogen unter Schwachlichtbedingungen. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 1 cm.

(Operoninsertion, Linie T91, Abb. 3.3A). Transplastome Linien wurden in mehreren aufeinanderfolgenden Regenerationsschritten zyklisiert, um das Verhältnis von transgenen zu Wildtyp-Plastomen in Richtung Mutante zu verschieben und die Linien homoplastomisch für die *petA*-Deletion zu bekommen.

Mit Hilfe der Southern-Analyse wurde dann überprüft, welche Linien den homoplastomischen Zustand erreicht hatten. Gesamt-DNA *petA*-defizienter Pflanzen wurde mit *Nco*I verdaut, die Fragmente auf einem Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Für die Hybridisierung wurde die Sonde P1 verwendet (siehe Abb. 2.1, Seite 24/25), womit sowohl transgenes als auch Wildtyp-Plastom detektiert werden konnte. Hybridisierte Wildtyp-DNA zeigte eine Fragmentgröße von 13082 bp, wohingegen *petA*-deletierte Plastom-DNA sich durch Fragmentgrößen von 7025 bp im Fall der Insertion der *aadA*-Expressionskassette (Linien T9 und T10) und 6899 bp im Fall der Operoninsertion (Linie T91) auszeichnete (Abb. 3.3B). In allen analysierten Linien war eine schwache Bande detektierbar, die eine vergleichbare Größe zur Wildtyp-Bande hatte. Da diese schwache Bande jedoch auch nach weiteren Regenerationszyklen vorhanden war, wurde angenommen, dass diese Linien homoplastomisch und die entsprechenden DNA-Fragmente nicht plastidären Ursprungs sind. Eine Erklärung für solche schwachen Banden könnten plastidäre DNA-Bereiche sein, die im Laufe der Evolution in den Kern gewandert sind, wie beschrieben in Ayliffe und Timmis (1992).

Homoplastomische Δ*petA*-Linien zeigten neben der lanzettförmigen Blattform den für diese Mutanten typische einen Licht-abhängigen Phänotyp mit einer blassgrünen Blattfarbe unter Schwachlichtbedingungen und gelblichweißen Blättern bei Standardbeleuchtung (Abb. 3.3C). Bedingt durch Photooxidation wiesen Blätter *petA*-defizienter Pflanzen bei Standardbeleuchtung in der Kulturkammer nach mehreren Wochen einen vollkommen weißen Phänotyp auf, wie dies auch bei Pflanzen im Gewächshaus beobachtet wurde (siehe Abb. 3.4). Aus diesem Grund wurden homoplastomische Δ*petA*-Pflanzen im Schwachlicht herangezogen (5,0 ± 1,0 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), um die durch die Lichtbleichung entstehenden Schäden des Blattgewebes zu verhindern. Die aus dem unterbrochenen Elektronentransport entstehende starke Chlorophyll-Fluoreszenz (‚high chlorophyll fluorescence', HCF) konnte bei Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm) nicht mit bloßem Auge gesehen werden. Jedoch war es möglich, bei *petA*-defizienten Keimlingen den HCF-

Phänotyp zu detektieren, indem die Fluoreszenz mit Hilfe von Rotlicht (690 nm) angeregt wurde (siehe Abschnitt 3.3.2).

Homoplastomische Δ*petA*-Linien wurden *in vitro* als Kallus/Spross-Kulturen erhalten und dienten als Ausgangsmaterial für die routinemäßige Anzucht von *petA*-Deletionsmutanten in Kirschgläsern. Pflanzen *petA*-defizienter Linien zeigten jedoch auf dem in der Regel für die Anzucht von Wildtyp-Pflanzen verwendeten B5-Medium kaum Wurzelbildung und nur ein sehr geringes Wachstum. Anders war dies auf MS- und RS-Medium, wo Δ*petA*-Sprosse normale Wurzeln ausbildeten und die Pflanzen gut heranwuchsen. Verglichen mit Wildtyp-Pflanzen waren sie generell aber etwas kleinwüchsiger, wobei der phänotypische Unterschied zwischen Wildtyp und der Mutante bei Schwachlichtbedingungen relativ geringfügig war (Abb. 3.3D). Δ*petA*-Linien, die auf diesen beiden Medien herangewachsen waren, wurden in Rekonstitutionsexperimenten eingesetzt (siehe Abschnitt 3.3.3).

3.3.2 Samenproduktion aus *petA*-defizienten Mutanten

Die langfristige Erhaltung von Kallus/Spross-Kulturen *in vitro* kann negative Folgen wie einen abnormalen Phänotyp oder eine reduzierte Fertilität haben, die aufgrund somaklonaler Veränderungen auftreten können. Daher ist die Produktion *petA*-defizienter Samen von großem Interesse, da so diese Probleme umgangen werden können. Da eine Blütenentwicklung von Tabakpflanzen *in vitro* sehr selten ist und homoplastomische Δ*petA*-Mutaten aufgrund ihrer Photosynthese-Defizienz im Gewächshaus nicht wachsen können, wurden heteroplastomische Linien mit einem stark segregierendem Phänotyp in Erde gepflanzt und großgezogen (Abb. 3.4A). Ausgewachsene Pflanzen zeigten drei verschiedene Phänotypen: dunkelgrüne Bereiche (Wildtyp-Plastom), chimäre Bereiche (mutante und Wildtyp-Plastome) und hellgrüne Bereiche, die je nach Alter bis ins Weiße ausgeblichen waren (ausschließlich mutante Plastome). Beispielhaft ist ein segregierendes Blatt in Abbildung 3.4B gezeigt, das auf der linken Hälfte einen chimären Phänotyp aufweist, auf der rechten Hälfte jedoch phänotypisch und folglich auch genotypisch homoplastomisch für die *petA*-Deletion ist. Von Samen aus chimären Samenkapseln (Abb. 3.4C) wurden Keimlinge erhalten, die unterschiedliche Phänotypen aufwiesen: dunkelgrün (Wildtyp), chimär (heteroplastomische Mutanten) und hellgrün (homoplastomische Mutanten). In den meisten Fällen wuchsen aus Samen von chimären

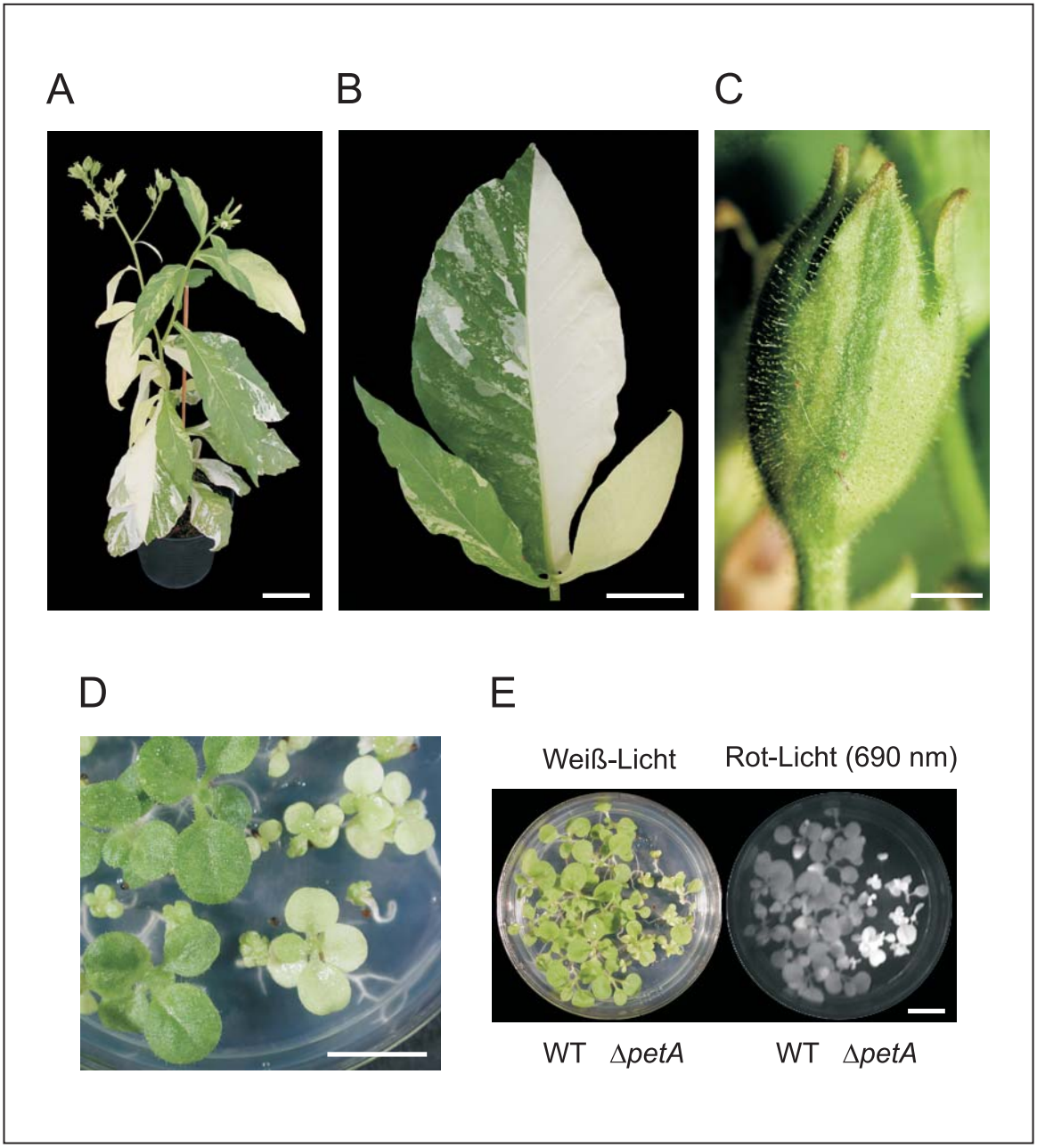


Abbildung 3.4 Samenproduktion von Δ*petA*-Mutanten. **A** Ausgewachsene blühende Δ*petA*-Pflanze (T339-1) im Gewächshaus mit deutlich chimärem Phänotyp. **B** Phänomen der Segregation gezeigt an einem Blatt der Linie T339-1 mit chimärem (linke Blatthälfte) und homoplastomisch mutantem (rechte Blatthälfte) Phänotyp. **C** Segregation in einer selbst-bestäubten Samenkapsel mit mutanten (hell-grün) und Wildtyp-gleichen Sektoren (dunkel-grün). **D** T1-Nachkommen einer chimären Samenkapsel mit Wildtyp-gleichem (links) und mutantem (rechts) Phänotyp. **E** Detektion von starker Chlorophyll-Fluoreszenz (HCF) in *petA*-defizienten Mutanten durch Fluoreszenz-Induktion mit Rotlicht (690 nm). Wildtyp-Kontroll-Keimlinge (jeweils links in der Petrischale) zeigen keine Fluoreszenz, Δ*petA*-Mutanten (jeweils rechts in der Petrischale) fluoreszieren deutlich Der Maßstabsbalken entspricht in **A** 10 cm, in **B** 5 cm, in **C** 2,5 mm und in **D** und **E** jeweils 1 cm.

Samenkapseln entweder Wildtyp-Keimlinge oder Mutanten (Abb. 3.4D), in seltenen Fällen Keimlinge mit einem segregierenden Phänotyp. Um die Sicherheit zu haben, dass die Samen von Δ*petA*-Mutanten homoplastomisch bezüglich der *petA*-Deletion sind, wurden Samen von rein mutanten Seitentrieben der heteroplastomischen Pflanze gewonnen. Deren Keimlinge zeigten ausschließlich einen mutanten Phänotyp.

Neben dem optisch sichtbaren hellgrünen Phänotyp *petA*-defizienter Keimlinge kann der durch die *petA*-Deletion verursachte Stau im Elektronentransport der photosynthetischen Membran als sogenannte ‚high chlorophyll fluorescence' (HCF) sichtbar gemacht werden. Die Bestrahlung von Wildtyp- und Δ*petA*-Keimlingen mit Lichtblitzen der Wellenlänge 690 nm (Rotlicht) resultierte in einer deutlichen Fluoreszenz der *petA*-defizienten Keimlinge (Abb. 3.4E). Die Verwendung dieser simplen Methode zur Differenzierung zwischen Wildtyp und Δ*petA*-Mutanten ist jedoch nur bei Blättern möglich. Kallusgewebe *petA*-defizienter Linien zeigt verglichen mit Wildtyp-Kallus eine fast nicht detektierbare Fluoreszenz. Dies macht es daher unmöglich, den HCF-Phänotyp als optischen Selektionsmarker zu verwenden.

3.3.3 Rekonstitution des *petA*-Gens

Für die Rekonstitution *petA*-defizienter Pflanzen wurde das neu etablierte *aphA-6*-Gen als Marker eingesetzt, um auf die Re-Insertion des deletierten *petA*-Gens selektieren zu können. Wie schon bei der Deletion des *petA*-Gens kamen in den Experimenten zur Rekonstitution ebenfalls zwei unterschiedliche Vektoren zum Einsatz: die Integration einer *aphA-6*-Expressionskassette 300 bp ‚downstream' zum *petA*-Gen (pICF599, siehe Abb. 2.1, Seite 24) und die Integration der kodierenden Region des *aphA-6*-Gens als Operoninsertion direkt hinter die kodierende Sequenz des *petA*-Gens (pICF790, siehe Abb. 2.1, Seite 25).

Für die Rekonstitutionsexperimente wurde ein Regenerationssystem für Protoplasten von Δ*petA*-Linien entwickelt. Reproduzierbare Erträge an Protoplasten aus mutantem Blattmaterial waren verglichen mit Erträgen an Wildtyp-Protoplasten etwa 50 % geringer, wobei die Enzymkonzentration für den Verdau verdoppelt worden war (0,5 % v/v). Des weiteren wurde bei der Einbettung die Anzahl mutanter Δ*petA*-Protoplasten pro Plastiknetz um 20-30 % auf ca. $1{,}1 \cdot 10^5$ PP/ml erhöht, da die Regenerations- und Teilungsrate im Vergleich zum Wildtyp geringer ausfiel. Nach der Einbettung wurden die Protoplasten für

die Zellwandbildung einen Tag im Dunklen inkubiert, bevor sie zur Regeneration unter Schwachlichtbedingungen (5,0 ± 1,0 µmol·m^{-2}·s^{-1}) weiterkultiviert wurden. Nach dem standardmäßig durchgeführten Beschuss wurden die Mikrokolonien zur Regeneration bei Standardbeleuchtung weiterkultiviert.

Für die Rekonstitution des *petA*-Gens wurde auch die PEG-Behandlung als Transformations-Methode herangezogen (T359), bei der die Anzahl der eingesetzten Protoplasten ebenfalls erhöht wurde. Anstatt der normalerweise eingesetzten 5·10^6 Zellen pro PEG-Transformation von Wildtyp-Protoplasten, wurden in Rekonstitutions-experimenten ca. 6,5·10^6 Protoplasten eingesetzt.

Die Selektion rekonstituierter Regenerate wurde auf RMOP-Medium mit 25 mg/l Kanamycin durchgeführt, unabhängig von den eingesetzten Transformationsvektoren. Der Grund dafür war, dass die Regeneration *petA*-defizienter Mikrokolonien auf 25 mg/l Kanamycin ausreichend gehemmt war und daher keine „falsch-positiven" Regenerate auftraten. Tabelle 3.4 fasst die Experimente zur Rekonstitution des *petA*-Gens unter Verwendung des *aphA-6*-Gens als Marker zusammen.

Tab. 3.4 Chloroplasten-Transformation: *petA*-Rekonstitution

Experiment #	Vektor	Methode (Anzahl Netze)	Analyse *
T202	pICF599	Mikrokolonie-Beschuss (12)	1/1
T222	pICF599	Mikrokolonie-Beschuss (27)	0/0
T359	pICF790	PEG-Behandlung (8)	1/1

* Transformanten/Regenerate

Rekonstituierte Regenerate zeichneten sich durch Resistenz gegenüber Kanamycin aus und zeigten einen dunkelgrünen Phänotyp, der auf die wiedererlangte Fähigkeit zur Photosynthese beruht (Abb. 3.5A). Diese Regenerate wurden zur Sprossbildung auf Antibiotika-freies RMOP-Medium gesetzt. In ersten PCR-Analysen wurde unter Verwendung zweier *aphA-6*-spezifischer Primer (o168/o169) das Vorhandensein des Markergens nachgewiesen, was sich durch ein PCR-Produkt von 479 bp zeigte. Positive Linien wurden dann auf die korrekte Insertion der Gene *petA* und *aphA-6* hin untersucht, wobei ein Marker-interner Primer (o169) verwendet wurde und ein Primer, der außerhalb

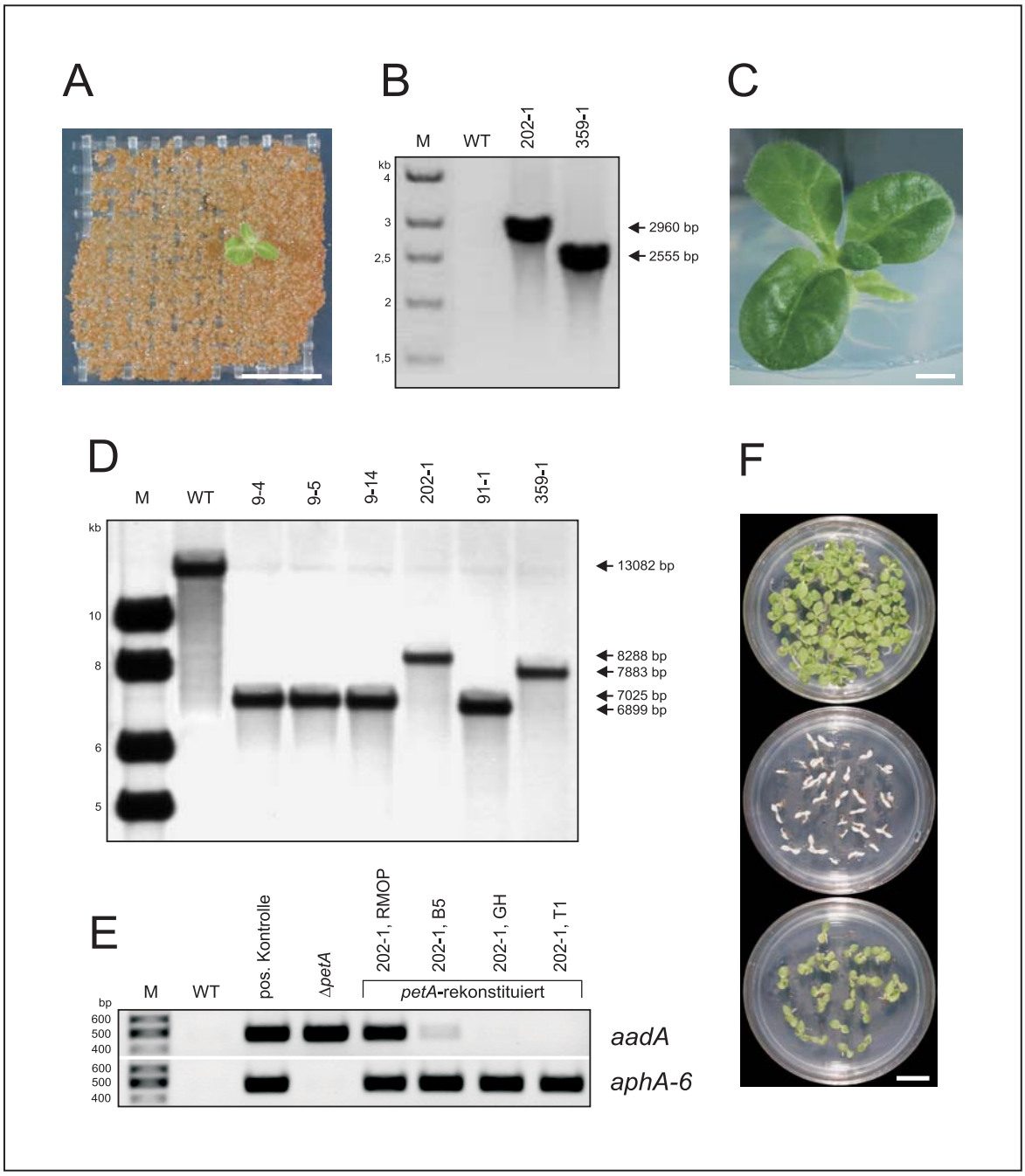


Abbildung 3.5 Rekonstitution des plastidären *petA*-Gens. Vektor-Konstruktionen, Primer-Bindestellen, Restriktionsschnittstellen und Sonden-Bindestellen siehe Abbildung 2.1 **A** Selektion eines Kanamycin-resistenter, dunkelgrünen Regenerats in *petA*-Rekonstitutions-Experimenten 5 Wochen nach dem Beschuss von Mikrokolonien. **B** PCR-Analyse *petA*-rekonstituierter Linien unter Verwendung eines Marker-spezifischen Primers (o169) und eines Primers, der außerhalb der linken Flanke bindet (o116). Die beiden *petA*-rekonstituierten Linien T202-1 (Insertion einer *aphA-6*-Expressionkassette) und T359-1 (Operon-Insertion des *aphA-6*-Gens) zeichneten sich durch PCR-Produkte von 2960 bp bzw. 2555 bp aus. Die Wildtyp-Kontrolle (WT) lieferte kein PCR-Produkt. M, MassRuler. **C** Rekonstituierte Pflanze (T202-1) mit Wildtyp-Phänotyp auf B5-Medium. **D** Southern-Analyse *petA*-deletierter und *petA*-rekonstituierter Linien unter Verwendung des Restriktionsenzyms *Nco*I für den Verdau und der Sonde P1 für die spezifische Hybridisierung. Die Wildtyp-Kontrolle (WT) lieferte ein Fragment von 13082 bp, wohingegen sich die beiden *petA*-rekonstituierten Linien T202-1 und T359-1 durch Fragmente von 8288 bp bzw. 7883 bp

der linken Flanke bindet (o116). Die korrekte Integration resultierte in einem PCR-Fragment von 2960 bp für die Insertion der Expressionskassette (Transformante T202-1) bzw. 2555 bp für die Operoninsertion (Transformante T359-1, Abb. 3.5B). Die Transformationseffizienz in den 3 Rekonstitutionsexperimenten (T202, T222 und T359, siehe Tab. 3.4) ist mit nur 2 Transformanten aus 39 Beschießungen von Mikrokolonien und einer PEG-Transformation sehr niedrig ist. Der Grund dafür ist das im Vergleich zum Wildtyp schlechtere Ausgangsmaterial, was trotz der erhöhten Anzahl an eingebetteten Protoplasten nicht kompensiert werden konnte.

Erste Sprosse rekonstituierter Regenerate wurden nach der PCR-Analyse direkt auf B5-Medium transferiert, dem Medium, auf dem photosynthetisch-aktive Linien im Vergleich zu *petA*-defizienten Defektmutanten eine normale Pflanzen-Regeneration zeigen. Der beobachtete Wachstumsvorteil photosynthetisch aktiver Pflanzen (Wildtyp- wie auch *petA*-rekonstituierte Pflanzen) auf B5-Medium sollte die Segregation zur Homoplasmie vorantreiben. Rekonstituierte Linien unterschieden sich weder phänotypisch noch im Wachstum vom Wildtyp (Abb. 3.5C). Aus diesem Erscheinungsbild rekonstituierter Linien konnte geschlossen werden, dass die Pflanzen bereits in diesem Stadium homoplastomisch für die *petA*-Re-Integration waren. Dies konnte durch Southern-Analysen bestätigt werden. Dafür wurde *Nco*I-verdaute Gesamt-DNA *petA*-rekonstituierter Pflanzen mit Sonde P1 (siehe Abb. 2.1, Seite 24/25) hybridisiert, womit sowohl rekonstituiertes als auch mutantes und Wildtyp-Plastom detektiert werden kann. Hybridisierte Wildtyp-DNA zeigte ein Fragment von 13082 bp, *petA*-deletierte Plastom-DNA zeichnete sich durch Fragmentgrößen von 7025 bp bzw. 6899 bp aus (siehe auch Abb. 3.3B). Bei den beiden

auszeichneten. Zum Vergleich wurden auch *petA*-deletierte Linien in den Southern-Blot integriert (Fragmente von 7025 bp bzw. 6899 bp, siehe Abb. 3.3). M, Größenmarker (MassRuler). **E** PCR-Analyse zur Bestimmung der beiden Markergene (*aadA*, oben, und *aphA-6*, unten) in der rekonstituierten Linie T202-1 zu verschiedenen Zeitpunkten im Laufe der Pflanzenentwicklung. Die Präsenz des *aadA*-Gens zeigt sich durch die Amplifikation eines 478 bp großen PCR-Produkts (Primerkombination o59/o60), die des *aphA-6*-Gens durch ein 479 bp großes Produkt (Primerkombination o168/o169). Die Wildtyp-Kontrolle (WT) war negativ für beide Markergene, die Positiv-Kontrollen (Plasmid-DNA von pICF558 bzw. pICF599 als PCR-‚template') waren entsprechend positiv. Die Δ*petA*-Mutante zeigte erwartungsgemäß nur das *aadA*-spezifische Signal. Die rekonstituierte Linie T202-1 zeigte in Abhängigkeit der Entwicklungsphase PCR-Produkte für beide Markergene (‚template'-DNA aus primärem Kalluswebe bzw. von Blattmaterial einer Pflanze *in vitro* auf B5-Medium) oder ausschließlich das *aphA-6*-spezifische Signal (‚template'-DNA aus Blattmaterial einer Gewächshauspflanze [GH] und von T1-Keimlingen). M, Größenmarker (MassRuler). **F** T1-Keimlinge der *petA*-rekonstituierten Linie T202-1 auf B5-Medium ohne Antibiotikum (oben), mit 500 mg/l Spektinomycin (Mitte) und mit 200 mg/l Kanamycin (unten) nach 2 Wochen Keimzeit. Der Maßstabsbalken in **A**, **C** und **F** entspricht jeweils 1 cm.

petA-rekonstituierten Linien T202-1 und T359-1 konnten die erwarteten Fragmente von 8288 bp (Kassetteninsertion) bzw. 7883 bp (Operoninsertion) detektiert werden (Abb. 3.5D). Der Southern-Blot zeigte zudem, dass beide rekonstituierten Linien keine mutanten Plastommoleküle aufwiesen und demzufolge homoplastomisch bezüglich der *petA*-Rekonstitution waren. Bei allen analysierten Linien wurde eine schwache Bande mit vergleichbarer Größe zum Wildtyp-Fragment detektiert. Da jedoch keine Unterschiede zwischen *petA*-deletierten und *petA*-rekonstituierten Linien zu sehen ist, kann angenommen werden, dass die DNA-Fragmente dieser Banden nicht plastidären Ursprungs sind. Dies bestätigte zudem, dass die als Donor-Material in den Rekonstitutions-experimenten eingesetzten Δ*petA*-Linien homoplastomisch für die Deletion des *petA*-Gens waren.

Als Konsequenz der Rekonstitution des *petA*-Gens war der Marker für die Selektion *petA*-defizienter Mutanten, das *aadA*-Gen, wieder aus dem plastidären Genom entfernt worden. Um das Verschwinden des *aadA*-Gens und die gleichzeitige Zunahme des zweiten Markergens (*aphA-6*) im Laufe der Entwicklung vom Kanamycin-resistenten Regenerat zur ausgewachsenen homoplastomischen Pflanze bestimmen zu können, wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine Marker-interne Primerkombination ausgewählt, mit deren Hilfe *aadA*- und *aphA-6*-Gen spezifisch nachgewiesen werden können (o59/o60 bzw. o168/o169, siehe Abb. 2.1, Seite 24). DNA der rekonstituierten Linie T202-1 wurde von primärem Kallusgewebe auf RMOP-Medium, von Blättern einer Pflanze auf B5-Medium, von Blättern einer Gewächshauspflanze und von T1-Keimlingen isoliert und als PCR-‚template' eingesetzt. Die Präsenz des *aadA*-Gens zeigt sich durch die Amplifikation eines 478 bp großen PCR-Produkts, die des *aphA-6*-Gens durch ein 479 bp großes Produkt. Als Kontrollen wurde Wildtyp-DNA, Positiv-Kontrollen (Plasmid-DNA der Transformationsvektoren pICF558 und pICF599) und DNA einer Δ*petA*-Mutante eingesetzt, bei denen entsprechende PCR-Produkte amplifiziert wurden bzw. erwartungsgemäß fehlten. Beim Einsatz von ‚template'-DNA aus primärem Kalluswebe wurden PCR-Produkte für beide Markergene erhalten, die gleiche Intensität aufwiesen. Eine deutliche Reduktion des PCR-Signals für das *aadA*-Gen war beim Einsatz von ‚template'-DNA aus Blattmaterial einer jungen Pflanze zu sehen, die auf B5-Medium gewachsen war. Das Signal für das *aphA-6*-Gen war vergleichbar mit der Positiv-Kontrolle. Für das *aadA*-Gen konnte kein PCR-Signal detektiert werden, wenn ‚template'-DNA aus Blattmaterial einer rekonstituierten Pflanze im Gewächshaus oder DNA aus T1-

Keimlingen eingesetzt wurde. In beiden Fällen wurde ein Signal für das *aphA-6*-Gen erhalten (Abb. 3.5E).

Die Weitervererbung des *aphA-6*-Gens an die nächste Generation (T1) wurde am Beispiel der selbstbestäubten rekonstituierten Transformante T202-1 gezeigt. Dabei wurden Samen dieser Linie auf B5-Medium ohne Antibiotikum, mit Spektinomycin (500 mg/l) oder mit Kanamycin (200 mg/l) gelegt (Abb. 3.5F). Die Keimfähigkeit war auf Medium ohne Antibiotikum und mit Kanamycin vergleichbar, wo alle Keimlinge einen grünen Phänotyp zeigten. Auf Spektinomycin-haltigem Medium blichen alle Keimlinge aus und zeigten einen Spektinomycin-sensitiven weißen Phänotyp.

3.4 Plastom-Integration des gesamten Transformationsvektors

Die Southern-Analyse *petA*-defizienter Linien der Transformation T65 zeigte neben den erwarteten Banden für die korrekte *petA*-Deletion ein zusätzliches starkes Signal in Linie 65-38, welches etwa eine Größe von 5,8 kb aufwies (Abb. 3.6A). Die *Nco*I-verdaute Gesamt-DNA war mit Sonde P1 (siehe Abb. 2.1, Seite 24) hybridisiert worden und wies bei allen Linien Signale von 7025 bp (Insertion der *aadA*-Kassette zur *petA*-Deletion) auf. Eine unspezifische Kreuzhybridisierung konnte aufgrund der Signalstärke einerseits und dem Fehlen diese Signals in allen anderen Linien andererseits ausgeschlossen werden. Eine anfangs wenig plausible, jedoch mögliche Erklärung war die Detektion des für die Transformation verwendeten Vektors pCIF558, welcher aufgrund der singulären *Nco*I-Schnittstelle in restringiertem Zustand eine Größe von 5852 bp aufweist.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass es sich bei der im Southern-Blot der Linie 65-38 (Regenerationszyklus 2) zusätzlich detektierten Bande tatsächlich um die Plasmid-DNA des Transformationsvektors handelt, wurde Gesamt-DNA dieser transplastomen Linie für die Transformation von *E.coli* eingesetzt (‚plasmid rescue'). Pro 100 ng Gesamt-DNA wurden ca. 3500 Ampicillin-resistente Bakterienkolonien gezählt. Neben Gesamt-DNA aus dem zweiten Regenerationszyklus wurde auch DNA dieser Transformante aus den Regenerationszyklen 3 und 4 für den ‚plasmid rescue' eingesetzt. Dabei wurden deutlich weniger Ampicillin-resistente Bakterienkolonien erhalten. Im Fall von Regenerationszyklus 3 waren es nur noch ca. 250 Kolonien pro 100 ng Gesamt-DNA, im Fall von Regenerationszyklus 4 nur noch eine Kolonie (Tab. 3.5). Auch wenn die jeweilige Anzahl an Bakterienkolonien keine absoluten Werte für die Anzahl an Plasmid-Molekülen in

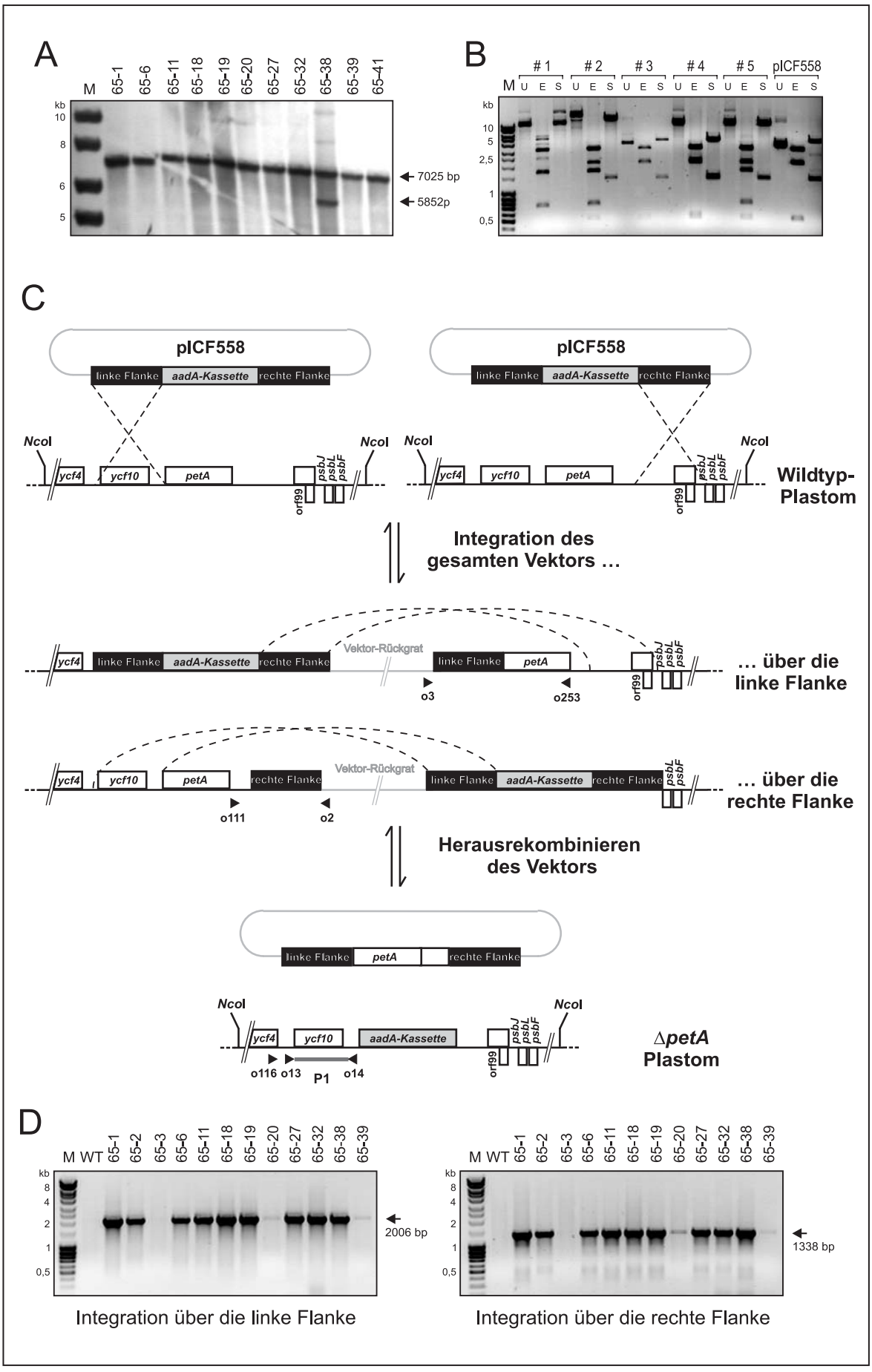
100 ng Gesamt-DNA sind, so zeigen diese Ergebnisse jedoch deutlich, dass in der transplastomen Linie 65-38 (Regenerationszyklus 2) Plasmid-DNA in großer Menge vorhanden war und daher selbst im Southern-Blot detektiert werden konnte. Jedoch scheint dies nur in Ausnahmefällen vorzukommen, und wie anhand dieses Beispiels gezeigt werden konnte, nimmt selbst in Linie 65-38 die Anzahl an freien Plasmid-Molekülen mit zunehmender Zyklisierung ab.

Tab. 3.5 ‚Plasmid rescue' aus Plastidentransformante 65-38

Regenerations-Zyklus	Amp^R-Kolonien/100 ng DNA
I	nicht bestimmt
II	~ 3500
III	~ 250
IV	~ 1

Um die Plasmid-Moleküle dieser Ampicillin-resistenten Bakterienklone auf ihre Art und Größe analysieren zu können, wurde Plasmid-DNA von fünf zufällig ausgewählten Bakterienklonen isoliert und mit *Eco*RI bzw. *Sma*I verdaut und neben ungeschnittener DNA auf einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 3.6B). Klon # 3 zeigte identische Restriktionsmuster wie die Kontrolle (pICF558), während alle anderen Klone nur teilweise (# 2, # 4 und # 5) oder keine (# 1) Restriktionsfragmente aufwiesen, die identisch zum Ausgangsvektor waren. Zudem war zu beobachten, dass alle Plasmide (bis auf # 3) im ungeschnittenen Zustand eine Größe von über 10 kb aufwiesen, was durch intermolekulare Rekombinationsereignisse zwischen zwei oder mehreren Plasmiden erklärt werden kann. Jedoch sind theoretisch denkbare Rekombinationsmöglichkeiten zwischen Plasmid-Molekülen untereinander bzw. zwischen Plasmid- und Plastommolekülen so vielfältig, dass genauere Erklärungen bestimmter Restriktionsmuster nahezu unmöglich sind und zudem sehr spekulativ wären. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass Plasmid-DNA in seltenen Fällen Plastom-integriert oder in freiem Zustand über einen längeren Zeitraum in Chloroplasten erhalten bleiben kann. Auf der anderen Seite wurde ebenfalls deutlich, dass es nur eine Frage der Zeit ist, bis die Plasmid-Moleküle aus der transplastomen Linie verschwinden.

Wie kann nun diese große Menge an Plasmid-DNA in der *petA*-deletierten Linie 65-38 (Regenerationszyklus 2) erklärt werden? Eine autonome Replikation des Transformationsvektors konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da


A
M
65-1
65-6
65-11
65-18
65-19
65-20
65-27
65-32
65-38
65-39
65-41
kb
10
8
6
5
7025 bp
5852p
B
1
2
3
4
5
pICF558
M U E S U E S U E S U E S U E S U E S
kb
10
5
2,5
1
0,5
C
pICF558
linke Flanke
aadA-Kassette
rechte Flanke
NcoI
ycf4
ycf10
petA
psbJ
psbL
psbF
orf99
Wildtyp-Plastom
Integration des gesamten Vektors …
Vektor-Rückgrat
o3
o253
… über die linke Flanke
o111
o2
… über die rechte Flanke
Herausrekombinieren des Vektors
o116
o13
P1
o14
ΔpetA Plastom
D
M WT 65-1 65-2 65-3 65-6 65-11 65-18 65-19 65-20 65-27 65-32 65-38 65-39
kb
8
4
2
1
0,5
2006 bp
1338 bp
Integration über die linke Flanke
Integration über die rechte Flanke

dies ansonsten auch in anderen Fällen beobachtet worden wäre. Aus diesem Grund kam die Idee auf, dass der gesamte Transformationsvektor im Plastom integriert und mitamplifiziert worden war. Die Integration von Fremd-DNA in das plastidäre Genom erfolgt über den Mechanismus der doppelt-reziproken Rekombination, bei der mit Hilfe zweier homologer Bereiche dazwischenliegende DNA-Sequenzen integriert werden können. Unter Verwendung entsprechender Primer konnte überraschenderweise die Integration des gesamten Transformationsvektors über eine homologe Flanke in das plastidäre Genom gezeigt werden. Dabei kann, wie in Abbildung 3.6C schematisch gezeigt ist, die Integration des gesamten Vektors sowohl über die linke als auch über die rechte Flanke erfolgen. Um eine Integration mittels einer Flanke nachweisen zu können, wurde ein Primer verwendet, der außerhalb einer der beiden Flanken im Plastom bindet, und ein Primer, der zu Sequenzen im Rückgrat des Vektors homolog ist. Eine Amplifikation dazwischenliegender Bereiche ist nur dann möglich, wenn der komplette Vektor ins Plastom integriert wurde. Beispielhaft konnte für verschiedene *petA*-Deletionsmutanten der Transformation T65 (Analyse primärer Regenerate) der Nachweis erbracht werden, dass der gesamte Vektor ins Plastom integriert wurde (Abb. 3.6D). Die Integration des Transformationsvektors über die ‚linke' Flanke konnte unter Verwendung der Primer o3/o253 nachgewiesen werden. In nahezu allen getesteten Linien konnte das PCR-Produkt von 2006 bp amplifiziert werden. Auch das Produkt für die Integration des gesamten Vektors über die ‚rechte' Flanke (1338 bp) war in nahezu allen Fällen zu sehen,

Abbildung 3.6 Integration des gesamten Transformationsvektors in das plastidäre Genom. A Die Southern-Analyse PCR-positiver Linien (Δ*petA*-Mutanten T65, *Nco*I-Verdau, hybridisiert mit Sonde P1) zeigte neben der erwarteten Bande für die *petA*-Deletion/*aadA*-Insertion (7025 bp) auch noch eine zusätzliche Bande in Linie 65-38. **B** Restriktionsanalyse von 5 Plasmid-Molekülen (# 1-5), die über Bakterien-Transformation aus Gesamt-DNA der *petA*-deletierten Pflanzenlinie 65-38 re-isoliert werden konnten. Alle Plasmide und eine Kontrolle (pICF558) wurden mit *Eco*RI (E) und *Sma*I (S) verdaut und zusammen mit ungeschnittener DNA (U) auf einem Gel aufgetrennt. **C** Schematische Darstellung der Integration des gesamten Transformationsvektors (pICF558) über die linke Flanke (links) oder die rechte Flanke (rechts). Durch die Verdopplung beider homologer Flanken kann entweder der Transformationsvektor in seiner ursprünglichen Form wieder herausrekombinieren (Rückreaktion des ersten Schritts), oder es kommt zu einer Rekombination zwischen den beiden verdoppelten anderen Flanken (gestrichelte Linien), was zur Deletion des *petA*-Gens führt. Die für PCR- und Southern-Analysen wichtigen Primer-Bindestellen, Restriktionsschnittstellen sowie Sonden-Bindestellen sind angezeigt. **D** PCR-Analyse der Integration des gesamten Transformationsvektors über eine Flanke unter Verwendung eines Vektor-spezifischen Primers (o2/o3, Bindestellen im Vektor-Rückgrat) und eines Plastom-spezifischen Primers (o111/o253). Ein PCR-Produkt von 2006 bp war signifikant für die Integration über die linke Flanke (o3/o253, linkes Gelphoto), ein Produkt von 1338 bp signifikant für die Integration über die rechte Flanke (o2/o111, rechtes Gelphoto). Die Wildtyp-Kontrollen (WT) lieferten jeweils kein PCR-Produkt.

resultierend aus der Verwendung der Primerkombination o2/o111. Bis auf wenige Ausnahmen konnte in allen transplastomen Linien auch der Nachweis der Integration des gesamten Transformationsvektors sowohl über die ‚rechte' wie auch die ‚linke' Flanke nachgewiesen werden. Fehlende PCR-Produkte für die Integration des gesamten Transformationsvektors in Linie 65-3 und schwache PCR-Produkte in den Linien 65-20 und 65-39 können dadurch erklärt werden, dass bei diesen Transformanten bereits in diesem frühen Regenerationsstadium ausschließlich oder nahezu ausschließlich die stabile Integration des *aadA*-Gens vorliegt.

Die Integration des gesamten Transformationsvektors durch Rekombination mittels einer Flanke ist ein reversibler Prozess. Demzufolge kann der vollständige Transformationsvektor über die Flanke, mit der er integrierte, auch wieder aus dem Plastom herausrekombinieren. Auf der anderen Seite kann es auch zur Rekombination zwischen den beiden Kopien der verdoppelten anderen Flanke kommen, was zur stabilen Integration der *aadA*-Expressionskassette führt (Abb. 3.4C). Die gleichzeitig deletierte Sequenz des *petA*-Gens ist dann auf dem herausrekombinierten Vektor lokalisiert, welcher theoretisch erneut mit Δ*petA*-Plastommolekülen rekombinieren kann. Auf diese Weise könnte die *aadA*-Kassette wieder aus dem Plastom entfernt werden. Diese theoretischen Prozesse der sich wiederholenden Integration und Exzision könnten daher das seltene Phänomen erklären, dass im Fall der Linie 65-38 (Regenerationszyklus 2) große Mengen an Plasmid-DNA selbst bei der Southern-Analyse detektiert werden konnten (Abb. 3.6A).

3.5 Herstellung markerfreier Plastidentransformanten

3.5.1 Rekonstitution von Δ*petA*-Mutanten unter mixotrophen Selektionsbedingungen

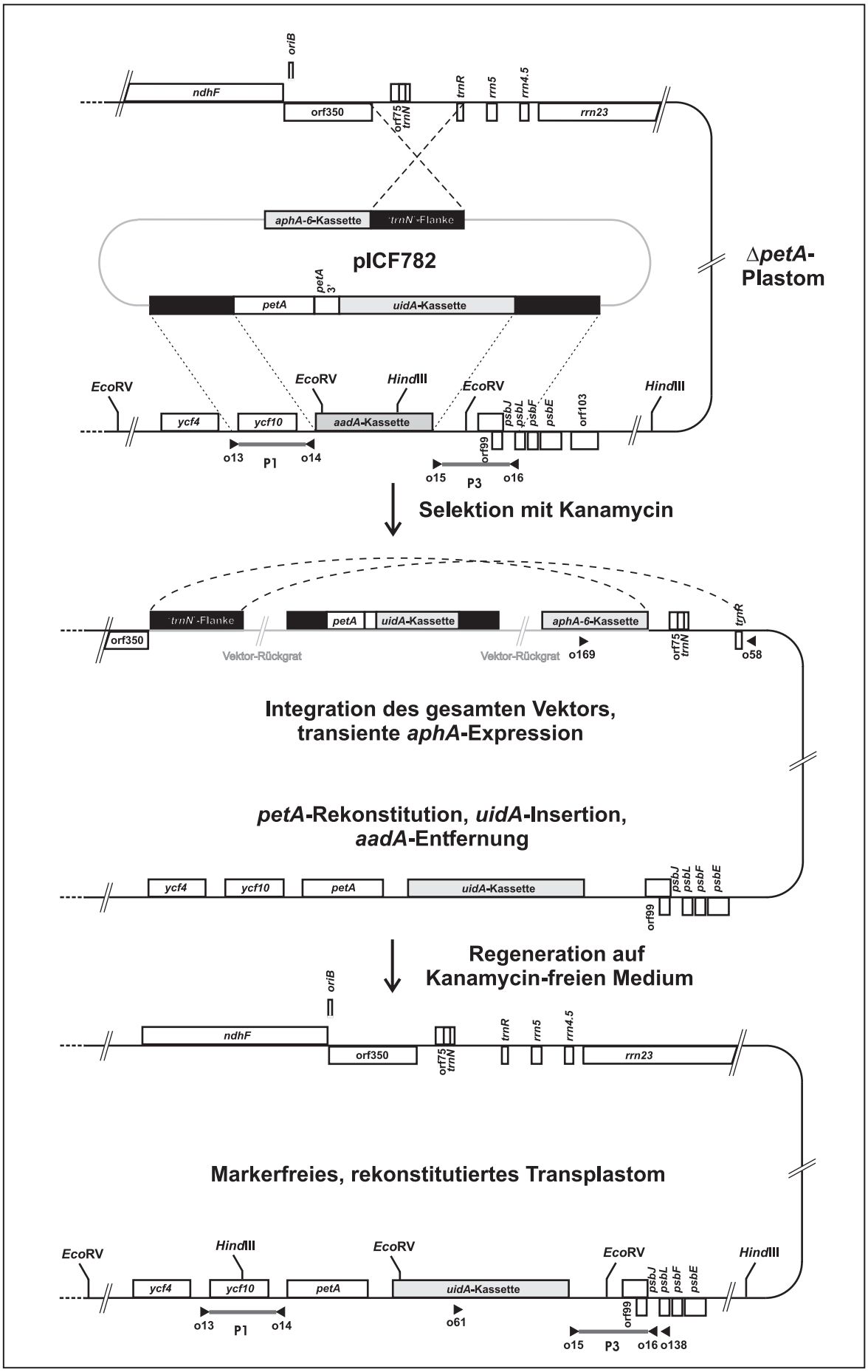
Neben Experimenten zur Rekonstitution des *petA*-Gens, bei denen das *aphA-6*-Gen als Marker zum Einsatz kam, wurde auch ein Vektor verwendet, bei dem kein zusätzliches Antibiotika-Resistenzgen stabil ins Plastom integriert werden sollte. In diesen Versuchen sollte unter Verwendung des Transformationsvektors pICF597 das *petA*-Gen zusammen mit dem *uidA*-Gen ins Plastom inseriert werden, wobei das re-integrierte *petA*-Gen als photosynthetischer Marker dienen sollte. Gleichzeitig sollte das *aadA*-Gen vom Plastom deletiert werden (siehe Abb. 2.1, Seite 24). In Anlehnung an die Komplementation

plastidärer Mutanten in *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton et al. 1988, Blowers et al. 1989) wurden in den Rekonstitutionsexperimenten Selektionsbedingungen geschaffen, die photosynthetisch aktiven Zellen einen Wachstumsvorteil geben sollten. Pflanzen wachsen in der Gewebekultur meist heterotroph und beziehen den für das Wachstum notwendigen Zucker aus dem Medium, weshalb die photosynthetische Zuckergewinnung eine vernachlässigbare Rolle spielt. Um die Pflanzen-eigene Zuckerproduktion auf Ebene der Photosynthese zu fördern, wurde die Zuckerkonzentration im Regenerationsmedium (RMOP) von standardmäßig 3 % auf 0,25-1,25 % reduziert (mixotrophe Selektionsbedingungen). Die Reduzierung des Zuckergehalts wurde in Testreihen mit Wildtyp und Δ*petA*-Mutanten bestimmt, indem Blattstücke zur Regeneration auf RMOP-Medium mit unterschiedlichen Zuckerkonzentrationen (0 %, 0,2 %, 0,4 %, 0,5 % und 1,0 %) gelegt wurden. Die Regenerationsfähigkeit von Δ*petA*-Mutanten war bei einer Konzentration von 1,0 % bereits stark eingeschränkt, und bei Konzentrationen von 0,2 % und darunter blich *petA*-defizientes Blattmaterial schnell aus und starb ab. Im Gegensatz dazu regenerierte der Wildtyp auf allen getesteten Medien, wobei die Sprossentwicklung im Vergleich zur normalen Zuckerkonzentration (3,0 %) langsamer verlief. Zudem war zu beobachten, dass mit reduziertem Zuckergehalt die photosynthetische Aktivität in den Sprossen zunahm, was anhand der dunkelgrünen Blattfarbe erkennbar wurde.

Tab. 3.6 Chloroplasten-Transformation: Mixotrophe Selektionsbedingungen

Experiment #	Vektor	Methode (Anzahl Netze)	Zucker-Konzentration	Regenerate
T209	pICF597	Mikrokolonie-Beschuss (14)	0,25 %	0
T371	pICF597	PEG-Behandlung (18)	0,75 %	0
T403	pICF597	PEG-Behandlung (18)	0,75-1,25 %	0

Bei den Transformationsexperimenten zur Rekonstitution des *petA*-Gens unter photosynthetischen Selektionsbedingungen kam sowohl der Beschuss von Δ*petA*-Mikrokolonien als auch die PEG-Behandlung von Δ*petA*-Protoplasten zum Einsatz. In keinem der 3 durchgeführten Experimente wurden jedoch dunkelgrüne Regenerate erhalten (Tab. 3.6). Auch wenn die Anzahl der Experimente für statistische Aussagen zu gering ist,

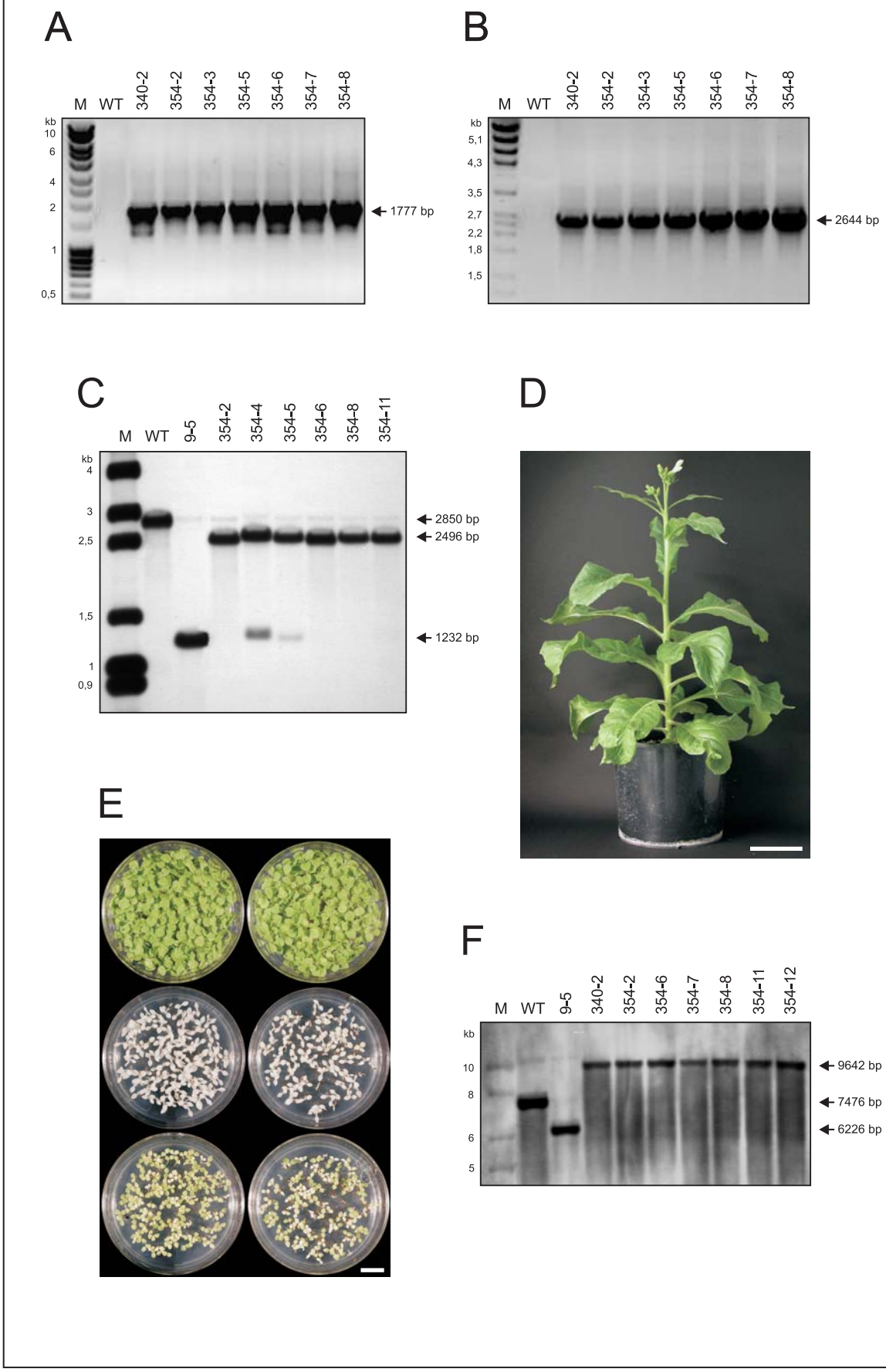

oriB
ndhF
orf350
orf75
trnN
trnR
rrn5
rrn4.5
rrn23
aphA-6-Kassette
3'trnN'-Flanke
pICF782
petA 3'
petA
uidA-Kassette
ΔpetA-Plastom
EcoRV
HindIII
ycf4
ycf10
aadA-Kassette
psbJ
psbL
psbF
psbE
orf103
orf99
o13
P1
o14
o15
P3
o16
Selektion mit Kanamycin
Vektor-Rückgrat
o169
o58
Integration des gesamten Vektors,
transiente aphA-Expression
petA-Rekonstitution, uidA-Insertion,
aadA-Entfernung
Regeneration auf
Kanamycin-freien Medium
Markerfreies, rekonstitutiertes Transplastom
o61
o138

so hatten diese Rekonstitutionsexperimente unter Verwendung eines reduzierten Zuckergehalts zur Förderung photosynthetisch aktiver Zellen ein gemeinsames Problem. Die zur Transformation eingesetzten Protoplasten und Mikrokolonien wurden bereits nach 3 Wochen Selektion auf RMOP-Medium mit reduziertem Zuckergehalt braun und starben langsam ab. Vor allem aus diesem Grund erschien es schwer möglich, potentiell rekonstituierte Δ*petA*-Mutanten aufgrund ihrer wiedererlangten Fähigkeit zur photosynthetischen Energiegewinnung selektieren zu können.

3.5.2 Rekonstitution von Δ*petA*-Mutanten mit Hilfe einer kombinierten Kanamycin/Photosynthese-Selektion

Da eine direkte photosynthetische Selektion *petA*-rekonstitutierter Linien nicht möglich war, wurde ein Selektionssystem entwickelt, bei dem sowohl auf eine kurzzeitige Kanamycin-Resistenz als auch auf Photosynthese-unterstütztes Wachstum selektiert werden sollte. Dabei kamen die in Abschnitt 3.4 beschriebenen neuen Erkenntnisse der Integration des gesamten Transformationsvektors ins plastidäre Genom zur Anwendung. In das Rückgrat des Transformationsvektors für die Rekonstitution unter Photosynthese-Bedingungen (pICF597, siehe Abb. 2.1, Seite 24) wurde eine *aphA-6*-Expressionskassette und ein zusätzliches plastidäres Fragment (‚*trnN*'-Flanke, 1,1 kb) kloniert, welches sich in anderen Plastidentransformations-Experimenten als besonders rekombinationsfreudig erwiesen hatte (mündliche Mitteilung, S. Mühlbauer, ICON Genetics). Der theoretische Ablauf der Kombination von *petA*-Rekonstitution und Integration des gesamten Vektors über eine zusätzliche Flanke ist schematisch in Abbildung 3.7 gezeigt. Neben der Re-Integration des *petA*-Gens, der Entfernung des ersten Markers (*aadA*) und der Integration des *uidA*-Gens über zwei Flanken durch doppelt-reziproke Rekombination kann der Transformationsvektor auch vollständig über die ‚*trnN'*-Flanke ins Plastom integrieren.

Abbildung 3.7 Schematische Darstellung der *petA*-Rekonstitution zur Herstellung markerfreier Plastidentransformanten. Der Rekonstitutionsvektor pICF782 enthält drei Plastom-homologe Sequenzen für die Rekombination (schwarze Boxen), von denen zwei als Flanken für die gleichzeitige *petA*-Rekonstitution, *uidA*-Insertion und *aadA*-Entfernung dienen. Der dritte homologe Bereich dient der Integration des gesamten Vektors über eine Flanke (‚*trnN*'-Flanke) zur kurzzeitigen Expression des *aphA-6*-Gens, welche Kanamycin-Resistenz vermittelt. Die Entfernung des Kanamycin-Selektionsdrucks führt zum Herausrekombinieren des Transformationsvektors über die verdoppelte ‚*trnN*'-Flanke (Rückreaktion, gestrichelte Linien). Spezifische Primer-Bindestellen für PCR-Analyse und Sonden-Herstellung (P2 und P3) sowie die Restriktionsschnittstellen für die Southern-Analyse und Sonden-Bindestellen sind angezeigt.


A
M WT 340-2 354-2 354-3 354-5 354-6 354-7 354-8
kb
10
6
4
2
1
0,5
1777 bp
B
M WT 340-2 354-2 354-3 354-5 354-6 354-7 354-8
kb
5,1
4,3
3,5
2,7
2,2
1,8
1,5
2644 bp
C
M WT 9-5 354-2 354-4 354-5 354-6 354-8 354-11
kb
4
3
2,5
1,5
1
0,9
2850 bp
2496 bp
1232 bp
D
E
F
M WT 9-5 340-2 354-2 354-6 354-7 354-8 354-11 354-12
kb
10
8
6
5
9642 bp
7476 bp
6226 bp

Tab. 3.7 Chloroplasten-Transformation: Markerfreie Plastidentransformanten

Experiment #	Vektor	Zielgewebe (Anzahl Netze)	Analyse *
T340	pICF782	Mikrokolonien (3)	1/2
T354	pICF782	Mikrokolonien (12)	11/12

* Transformanten/Regenerate

Letzteres ermöglicht eine kurzzeitige plastidäre Expression des *aphA-6*-Gens, was transformierten Zellen auf Kanamycin-haltigem Medium einen Selektionsvorteil einbringt. Δ*petA*-Mikrokolonien wurden unter Verwendung der ‚particle gun'-Methode mit DNA-beladenen Goldpartikeln beschossen und auf RMOP-Medium mit 25 mg/l Kanamycin selektiert. Erste Regenerate erschienen 6-8 Wochen nach dem Beschuss und zeichneten sich durch den für rekonstituierte Linien typischen dunkelgrünen Phänotyp aus. In zwei Transformationsexperimenten (T340 und T354) wurden insgesamt 15 Netze beschossen, von denen 14 Kanamycin-resistente Regenerate erhalten wurden (Tab. 3.7). Diese wurden direkt auf Kanamycin-freies RMOP-Medium transferiert.

Erste Analysen zum Nachweis der *petA*-Rekonstitution und *uidA*-Insertion wurden mit Hilfe der PCR durchgeführt. Dabei wurde in einem ersten Test unter Verwendung der

Abbildung 3.8 Herstellung markerfreier Plastidentransformanten durch *petA*-Rekonstitution. Vektor-Konstruktion, Primer-Bindestellen, Restriktionsschnittstellen und Sonden-Bindestelle siehe Abb. 3.7 **A** PCR-Analyse Kanamycin-resistenter Regenerate unter Verwendung eines *uidA*-spezifischen Primers (o61) und eines Primers, der außerhalb der rechten Flanke bindet (o138). Die Rekonstitution des *petA*-Gens verbunden mit der gleichzeitigen Insertion des *uidA*-Gens und der Entfernung des *aadA*-Gens lieferte ein PCR-Produkt von 1777 bp (Linien T340 und T354). Die Wildtyp-Kontrolle (WT) lieferte kein PCR-Produkt. M, Größenmarker (MassRuler). **B** PCR-Nachweis der Integration des gesamten Transformationsvektors über die ‚*trnN*'-Flanke mit Hilfe der Primerkombination o58/o169. Alle *petA*-rekonstituierten Linien (positiv in **A**) zeigten das erwartete Produkt von 2644 bp. Die Wildtyp-Kontrolle (WT) lieferte kein PCR-Produkt. M, Größenmarker (λ DNA/*Eco*130I/*Mlu*I) **C** Southern-Analyse PCR-positiver, markerfreier Plastidentransformanten unter Verwendung des Restriktionsenzyms *Eco*RV für den Verdau und der Sonde P1 für die spezifische Hybridisierung. Die Wildtyp-Kontrolle (WT) lieferte ein Fragment von 2850 bp, die Δ*petA*-Kontrolle ein Fragment von 1332 bp (T9-5) und die rekonstituierten Linien ein Fragment von 2496 bp (Linien T354). M, Größenmarker (MassRuler). **D** Markerfreie *petA*-rekonstituierte Pflanze. **E** T1-Keimlinge einer WT-Kontrolle (links) und der markerfreien *petA*-rekonstituierten Linie T354-8 (rechts) auf B5-Medium ohne Antibiotikum (oben), mit 500 mg/l Spektinomycin (Mitte) und mit 200 mg/l Kanamycin (unten) nach 2 Wochen Keimzeit. **F** Southern-Analyse der T1-Generation markerfreier Plastidentransformanten unter Verwendung des Restriktionsenzyms *Hind*III für den Verdau und der Sonde P3 für die spezifische Hybridisierung. Die beiden Kontrollen, Wildtyp (WT) und Δ*petA*-Mutante (Linie T9-5), lieferten Fragmente von 7476 bp bzw. 6226 bp, wohingegen alle Keimlinge markerfreier transplastomer Tabaklinien (T340, T354) sich durch Fragmente von 9642 bp auszeichneten. M, Größenmarker (MassRuler). Der Maßstabsbalken in **D** entspricht 10 cm, in **E** 1 cm.

Primer o61/o62 (siehe Abb. 2.1, Seite 24) das Vorhandensein des *uidA*-Gens nachgewiesen, was sich in einem 457 bp großen PCR-Produkt bestätigte. Um die korrekte Plastomintegration des *uidA*-Gens nachzuweisen wurde ein *uidA*-interner Primer (o61) verwendet in Kombination mit einem Primer, der außerhalb der rechten Flanke bindet (o138, siehe Abb. 3.7). 12 der 14 Linien zeigten ein positives Signale (1777 bp) für die korrekte Insertion des *uidA*-Gens und die damit verbundene Rekonstitution des *petA*-Gens (Abb. 3.8A). Die beiden für die *uidA*-Integration negativen Linien wiesen bereits zum Zeitpunkt der Analyse einen weniger grünen Phänotyp auf, und erste Sprosse zeigten wenig später den für *petA*-defiziente Linien typischen Phänotyp. Neben dem Nachweis der *uidA*-Insertion konnte die Integration des gesamten Transformationsvektors über die ‚*trnN*'-Flanke ebenfalls mit Hilfe der PCR-Analyse gezeigt werden. Unter Verwendung eines *aphA-6*-internen Primers (o169) und eines Primers, der außerhalb der ‚*trnN*'-Flanke bindet (o58, siehe Abb. 3.7), konnte in allen *uidA*-positiven Linien auch die Integration des gesamten Vektors nachgewiesen werden. Dies zeigte sich anhand des PCR-Produkts von 2644 bp, wie in Abbildung 3.8B zu sehen ist.

Zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse für die Herstellung markerfreier Plastiden-transformanten in *petA*-Rekonstitutionsexperimenten wurde eine Southern-Analyse durchgeführt. Diese sollte vor allem zeigen, dass auch ohne stabile Integration eines Antibiotika-Selektionsgens *petA*-rekonstituierte markerfreie Linien sehr schnell den homoplastomischen Zustand erreichen. Gesamt-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Eco*RV geschnitten, die Fragmente auf einem Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Für die Hybridisierung wurde Sonde P1 verwendet, die sowohl an Wildtyp- als auch an mutante und rekonstituierte Plastommoleküle bindet. Die beiden Kontrollen zeigten Fragmentgrößen von 2850 bp (Wildtyp) bzw. 1232 bp (Δ*petA*-Linie 9-5), wohingegen alle markerfreien Linien sich durch eine Fragmentgröße von 2496 bp auszeichneten (Abb. 3.8C). Abgesehen von den Linien T354-4 und -5 waren alle Linien homoplastomisch bezüglich *petA*-Rekonstitution und *uidA*-Insertion. Dies ist besonders beachtlich hinsichtlich der Tatsache, dass alle analysierten Linien nicht (T354-8 und -11) oder maximal einmal (T354-2, -4, -5 und -6) auf nicht selektivem Medium zyklisiert worden waren.

Wie von den Ergebnissen zur Rekonstitution des *petA*-Gens unter Verwendung der stabilen Integration des *aphA-6*-Markers bereits bekannt war, zeigten auch alle markerfreien Pflanzen im Gewächshaus einen normalen, Wildtyp-gleichen Phänotyp (Abb. 4.8D) und produzierten fertile T1-Nachkommen. Oberflächensterilisierte Samen dieser *petA*-

rekonstituierten, markerfreien Plastidentransformanten wurden zur Keimung auf B5-Medium mit Spektinomycin und Kanamycin bzw. ohne Antibiotikum ausgelegt. Alle T1-Keimlinge waren entsprechend der Annahme, dass sie markerfrei sind, sensitiv gegenüber beiden Antibiotika und keimten normal auf Antibiotika-freiem Medium (Abb. 3.8E). Um weitere Nachweise zu liefern, dass diese transplastomen Pflanzenlinien keines der beiden Markergene mehr enthalten, wurde von jeder Linie Gesamt-DNA aus 10-20 Keimlingen isoliert, die für die PCR-Analyse eingesetzt wurde. Unter Verwendung der Marker-internen Primerkombinationen o59/o60 für das *aadA*-Gen bzw. o168/o169 für das *aphA-6*-Gen wurde in keiner der analysierten T1-Nachkommenschaft der Linien T340-2, T354-2, -6, -7, -8, -11 und -12 ein PCR-Produkt erhalten.

Die aus den T1-Keimlingen isolierte Gesamt-DNA wurde auch zur Southern-Analyse eingesetzt, um die Vererbung der rekonstituierten Plastome an die T1-Generation nachzuweisen. *Hind*III-geschnittene DNA-Fragmente wurden mit Sonde P3 (siehe Abb. 3.7) hybridisiert, die sowohl an Wildtyp- als auch an rekonstituierte (und mutante) Plastommoleküle bindet. Die Wildtypkontrolle zeigte die erwartete Fragmentgröße von 7476 bp, die Δ*petA*-Mutante die erwartete Bande von 6226 bp. Alle markerfreien Chloroplasten-Transformanten zeichneten sich auch in der T1-Generation durch hybridisierte Fragmente von 9642 bp aus (Abb. 3.8F). Der Southern-Blot zeigt zudem deutlich, dass alle markerfreien Tabaklinien homoplastomisch für die *petA*-Rekonstitution und *uidA*-Insertion waren und keine restlichen Wildtyp- oder Δ*petA*-Plastommoleküle vorhanden waren. Die im Vergleich zum Wildtyp und der Δ*petA*-Mutante etwas schwächeren Southern-Signale bei den markerfreien Linien können durch die geringere Menge an plastidärer DNA in der Gesamt-DNA der Keimlinge erklärt werden.

Neben den molekularbiologischen Nachweisen der *petA*-Rekonstitution und *uidA*-Insertion in markerfreien Tabaklinien konnte auch auf histologischem Weg die Anwesenheit des *uidA*-Gens nachgewiesen werden. Die GUS-Färbung in Blättern und T1-Keimlingen dieser Tabaklinien war zwar vergleichen mit einer Wildtyp-Kontrolle sichtbar, jedoch nur äußerst schwach. Der eindeutig homoplastomische Zustand dieser Linien in der T1-Generation steht so im direkten Kontrast zu einer schwachen GUS-Färbung. Da jedoch auch in Enzymaktivitäts-Analysen nur eine sehr geringe Glucuronid-Umsatzrate durch das GUS-Protein festgestellt werden konnte (Experimente durchgeführt von S. Herz, ICON Genetics), lässt dies entweder auf eine sehr geringe Expression oder auf ein mutantes GUS-Protein schließen, welches den Farbstoff X-Gluc nur ineffizient spaltet.

4 Diskussion

4.1 Das *aphA-6*-Gen als neuer effizienter plastidärer Selektionsmarker in höheren Pflanzen

Mikrokolonien als Zielgewebe für die Plastidentransformation

Die Verwendung von Protoplasten für die Plastidentransformation in Kombination mit Polyethylenglykol (Golds et al. 1993, O'Neill et al. 1993) ist schon seit einiger Zeit eine effiziente Alternative zum Beschuss von Blättern (Svab et al. 1990). Der ‚particle gun'-Beschuss von eingebetteten Mikrokolonien stellte sich als eine weitere effiziente Methode zur Transformation des plastidären Genoms von Tabak heraus, welche vor allem den hohen Arbeitsaufwand des Blätterschneidens und des Transfers der Blattstücke auf neues Medium deutlich reduziert. Trotz des zusätzlichen Zeitaufwands für die Protoplasten-Isolierung ist der absolute Arbeitsaufwand von Transformation und Selektion unter Verwendung der Mikrokolonien um ca. 60-70% reduziert. Auch wenn die Effizienz bezogen auf die Anzahl eingesetzter Protoplasten im Vergleich zu publizierten Ergebnissen von PEG-Transformationsexperimenten (Koop et al. 1996, De Santis-Maciossek et al. 1999) in der Regel etwas niedriger war, so eröffnet der Beschuss von Mikrokolonien jedoch ein neues Zielgewebe für die Chloroplasten-Transformation. Der deutlich geringere Zeitaufwand könnte u.a. Experimente zum Testen verschiedener Transformationsvektoren erleichtern. Auch könnte diese neue Methode für die Plastidentransformation neuer Pflanzenarten von Interesse sein, bei denen die genetische Veränderung auf Ebene der Chloroplasten noch nicht erreicht wurde.

Das aphA-6-Gen als plastidärer Marker

Das bakterielle *aphA-6*-Gen konnte als neuer effizienter Antibiotikum-Resistenzmarker in der Plastidentransformation höherer Pflanzen etabliert werden. Es hat einen prokaryotischen Ursprung (Martin et al. 1988) und kodiert wie das in der Plastidentransformation ebenfalls eingesetzte *nptII*-Makergen (Carrer et al. 1993) für ein Enzym, das zur Familie der Phosphotransferasen (Shaw et al. 1993, Wright und Thompson 1999) gehört. Nachdem kürzlich gezeigt werden konnte, dass das *aphA-6*-Gen ein zuverlässiger Marker in der Chloroplasten-Transformation von *Chlamydomonas reinhardtii* ist (Bateman und Purton 2000), konnte dies jetzt auch auf höhere Pflanzen

übertragen werden. In mehreren Experimenten konnte gezeigt werden, dass das *aphA-6*-Gen ein effizienter Marker für die Plastidentransformation von Tabak ist, wenngleich die absolute Transformationseffizienz im Vergleich zum *aadA*-Gen etwas niedriger ist. Für den Beschuss von Tabakblättern mit *aadA*-Konstrukten wird in der Regel eine Effizienz von 0,5-5 Transformanten pro Schuss beschrieben (Svab und Maliga 1993, Sugita et al. 1997, Daniell et al. 1998, Khan und Maliga 1999). Bei der Verwendung des *aphA-6*-Gens als Plastidenmarker zur neutralen Insertion ‚downstream' zum *petA*-Gen wurde eine Effizienz von 0,5-1 Transformanten pro Beschuss eingebetteter Mikrokolonien erreicht. Bei der PEG-Behandlung von $5 \cdot 10^5$ Protoplasten wurden im Schnitt 9 Transformanten erzielt, was etwas unter dem durchschnittlichen Ertrag von 10-40 Transformanten aus $5 \cdot 10^5$ Protoplasten bei der Verwendung des *aadA*-Gens als Marker liegt (Koop et al. 1996, De Santis-Maciossek et al. 1999). Bezüglich der Integration des *aphA-6*-Gens als Expressionskassette oder Operoninsertion wurden keine Unterschiede in der Effizienz festgestellt.

Verglichen mit dem plastidären Kanamycin-Resistenzmarker *nptII*, bei dem aus 25 beschossenen Blättern durchschnittlich eine Transformante erhalten wurde (Carrer et al. 1993), ist nicht nur die Effizienz des *aphA-6*-Gens als Plastidenmarker deutlich höher. Auch wurden in den hier beschriebenen Experimenten nur wenige nicht plastidäre Kanamycin-resistente *aphA-6*-Transformanten gefunden (3 bei insgesamt 28 Plastidentransformanten). Bei der Verwendung des *nptII*-Gens hingegen waren neben den 3 plastidären Transformanten auch noch 96 Kerntransformanten selektiert worden. Die erfolgreiche Verwendung des *aphA-6*-Gens als plastidärer Marker in Kombination mit dem Beschuss von Mikrokolonien kann anhand einer Reihe von Gründen erklärt werden. Die im Vergleich zu Blattgewebe geringere Anzahl von Plastiden in den Zellen von Mikrokolonien und die zudem deutlich reduzierte Anzahl an Plastommolekülen pro Chloroplast (Thomas und Rose 1983) könnte in einer veränderten Selektionskinetik resultieren. Theoretisch ist es daher möglich, dass die Verteilung transgener Plastommoleküle auf die Tochterzellen vor einem reduzierten Hintergrund an Wildtyp-Plastomen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit abläuft und somit die Zunahme Kanamycin-resistenter Zellen verstärkt wird. In mehreren Experimenten unter Verwendung des *nptII*-Gens in Kombination mit eingebetteten Mikrokolonien wurden nur wenige Kanamycin-resistente Regenerate erhalten, die sich nicht als Plastiden-transformanten bewahrheiteten (mündliche Mitteilung, T. Golds, ICON Genetics).

Mit dem *aphA-6*-Gen konnte erstmals ein alternativer effizienter Antibiotikum-Resistenzmarker zum *aadA*-Gen für die Plastidentransformation höherer Pflanzen etabliert werden. Die Integration der kodierenden Region eines Markergens ohne zusätzliche Regelelemente für die Expression wurde erstmals in Staub und Maliga (1995) beschrieben. In dieser Arbeit wurde die kodierende Sequenz des *uidA*-Gens, mit einer vorangesetzten ribosomalen Bindestelle (RBS) ausgestattet, direkt hinter das *rbcL*-Gen ins plastidäre Genom integriert. Die Expression des GUS-Proteins aus dem neu entstandenen Operon *rbcL-uidA* wurde ausschließlich durch endogene plastidäre Regelelemente des *rbcL*-Gens kontrolliert. Die Operoninsertion hat im Vergleich zur Integration einer Expressionskassette den Vorteil, dass bei der Klonierung des Transformationsvektors nicht verschiedenste Regelelemente zusammenkloniert werden müssen. Zudem kann die Verdoppelung plastidärer Regelelemente, die typischerweise in Expressionskassetten verwendet werden, verhindert werden. Homologe Rekombination zwischen verdoppelten Elementen können zum Verlust dazwischenliegender plastidärer Sequenzen führen (Svab und Maliga 1993, Shikanai et al. 1998, Eibl et al. 1999, Corneille et al. 2001, Huang et al. 2002).

Für die Operoninsertion des *aphA-6*-Gens wurde die kodierende Region direkt hinter das Stopcodon des *petA*-Gens kloniert, verbunden durch eine ribosomale Bindestelle für die Translation. Die Insertion des *aphA-6*-Gens an dieser Plastomstelle erhöhte die Anzahl der Gene im *psaI*-Operon auf 5 (*psaI-ycf4-ycf10-petA-aphA-6*), die alle unter der Kontrolle des *psaI*-Promoters stehen. Bei der Bestimmung der *aphA-6*-Expression bzw. der höchsten vermittelten Kanamycintoleranz wurden homoplastomische Transformanten verglichen, bei denen das *aphA-6*-Gen unter Kontrolle des 16S-Promoters exprimiert wird (Kassetteninsertion) oder unter Kontrolle des endogenen *psaI*-Promoters (Operoninsertion) steht. Die höchste tolerierte Kanamycin-Konzentration bei Transformanten mit Kassetteninsertion (100 mg/l, im Vergleich zu 25 mg/l bei der Operoninsertion) kann höchst wahrscheinlich durch eine erhöhte Expression erklärt werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei der neutralen Operoninsertion des *aphA-6*-Gens ‚upstream' zum *ycf3*-Gen festgestellt (Huang et al. 2002). Hier wurde an das 3'-Ende der kodierenden Sequenz des *aphA-6*-Gens eine ribosomale Bindestelle kloniert, die der Translation des *ycf3*-Gens diente. Das relativ niedrige oberste Resistenzniveau von 25 mg/l Kanamycin kann hier ebenfalls durch eine reduzierte Expression in Abhängigkeit der regulatorischen Elementen erklärt werden.

4.2. Deletion und Rekonstitution des plastidären *petA*-Gens

In diesem Teil der Arbeit konnte erstmals die Deletion und die darauffolgende Rekonstitution eines Plastiden-kodierten Gens in höheren Pflanzen gezeigt werden. Für die beiden aufeinanderfolgenden Transformationsschritte kamen das standardmäßig in der Plastidentransformation eingesetzte *aadA*-Gen (Svab et al. 1993) und das neu etablierte *aphA-6*-Gen zum Einsatz. Die plastidäre Δ*petA*-Mutante zeigte einen für Photosynthese-defiziente Tabakpflanzen typischen Phänotyp mit hellgrünen Blättern und einer starken Chlorophyll-Fluoreszenz (HCF) bei Anregung mit Lichtblitzen der Wellenlänge 690 nm. Im Gegensatz zu Standardselektions-Protokollen, die ausschließlich auf Antibiotika-Selektion beruhen, hat die Rekonstitution der plastidären Δ*petA*-Mutante den großen Vorteil, dass alle rekonstituierten Regenerate einen deutlich sichtbaren Phänotyp aufweisen, anhand dessen eine Differenzierung zu mutantem Gewebe sehr einfach ist. Bisherige Versuche, die Antibiotika-Selektion mit einem phänotypischen, ‚non-destructive'-Marker zu verbinden, beruhen auf der Kombination des *aadA*-Gens mit dem ‚green fluorescent protein' (GFP) der Tiefseequalle *Aequorea victoria*. In zwei publizierten Beispielen konnte die grüne Fluoreszenz Spektinomycin-resistenter Regenerate unterstützend zur Selektion von Chloroplasten-Transformanten höherer Pflanzen eingesetzt werden (Sidorov et al. 1999, Khan und Maliga, 1999). Diese Phänotyp-unterstützte Selektion plastidärer Transformanten ist vergleichbar mit der Rekonstitution *petA*-defizienter Mutanten, wo ebenfalls alle visuell differenzierbaren Regenerate Plastidentransformanten waren. Der große Vorteil der Mutanten-Rekonstitution ist jedoch, dass rekonstituierte Regenerate sehr einfach mit dem Auge detektiert werden können, wohingegen die grüne Fluoreszenz des GFP nur unter Verwendung eines teuren Fluoreszenz-Detektionssystems sichtbar gemacht werden kann. Zudem kann nur eine starke GFP-Expression zur visuell unterstützten Selektion verwendet werden, während bei der *petA*-Rekonstitution die natürliche Expression ausreicht, um transplastome Regenerate optisch selektieren zu können. Regelmäßig auftretende Probleme bei der ausschließlichen Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen für die Selektion, wie sie auch bei den Transformationsergebnissen zur Deletion des *petA*-Gens auftraten, können mit Hilfe optischer Selektionssysteme umgangen werden. In den *petA*-Deletionsexperimenten waren nur 53 von 96 Spektinomycin-resistenten Regeneraten laut PCR-Analyse positiv für die

korrekte *aadA*-Insertion, was einem Wert von 43 % „Falsch-positiven“ (spontane Mutanten, Kern-Integrationen oder ‚escapes’) entspricht.
Neben den Vorteilen der phänotypischen Selektion ist die Schnelligkeit, mit der *petA*-rekonstituierte Linien homoplastomisch werden, von großer Bedeutung, was vermutlich mit der Wiederherstellung der Fähigkeit zur photosynthetischen Energiegewinnung erklärt werden kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass in der Regel mehrere Regenerationszyklen notwendig sind, um Plastidentransformanten homoplastomisch für die Markerinsertion zu bekommen. Die Anzahl der Regenerationszyklen zur Entfernung der Wildtyp-Plastome variiert dabei von 1-2 Zyklen (Staub und Maliga 1995a, Sugita et al. 1997) bis zu 4-6 Zyklen (Ruf et al. 1997, Eibl et al. 1999). In rekonstituierten Linien war die deutliche Zunahme rekonstituierter Plastommoleküle bereits nach dem Transfer primärer Regenerate von Kanamycin-haltigem auf Antibiotika-freies Medium zu beobachten, was anhand des Wildtyp-gleichen Phänotyps ersichtlich war.
Die Transformationseffizienz in den Rekonstitutionsexperimenten war im Vergleich zur neutralen Insertion des *aphA-6*-Gens sehr niedrig. Dies ist zum einen auf die geringe Anzahl an durchgeführten Experimenten zurückzuführen, die nur die generelle Durchführbarkeit der Rekonstitution des zuvor deletierten *petA*-Gens zeigen sollten. Auf der anderen Seite ist das mutante Ausgangsmaterial im Vergleich zum Wildtyp deutlich variabler, was die Qualität und Regenerationsfähigkeit der Δ*petA*-Protoplasten betrifft.

Die Southern-Analysen zur neutralen Insertion der Marker-Gene *aadA* und *aphA-6* ‚downstream’ zum *petA*-Gen wie auch die zur *petA*-Deletion und -Rekonstitution zeigten jeweils schwache Banden mit einer vergleichbaren Größe zum Wildtyp-Fragment. Selbst nach mehrfachen Regenerationszyklen konnte der homoplastomische Zustand dieser transplastomen Linien scheinbar nicht erreicht werden. Eine mögliche Erklärung für diese Fragmente könnten in das Kerngenom gewanderte Plastombereiche sein (‚promiscuous DNA’), was bezogen auf Tabak mindestens für ein Drittel aller Plastomsequenzen nachgewiesen werden konnte (Ayliffe und Timmis, 1992). Auch der konstante DNA-Transfer von den Chloroplasten in den Kern konnte kürzlich anhand eines Plastiden-lokalisierten und später im Kern wiedergefundenen Kanamycin-Markers nachgewiesen werden (Huang et al., unveröffentlicht). Der Transfer plastidärer Sequenzen in das mitochondriale Genom, wie dies bei Reis (*Oryza sativa*) nachgewiesen werden konnte (Nakazono und Hirai 1993), könnte die Banden auf dem Southern-Blot ebenfalls erklären. In der ersten Veröffentlichung der Deletion des plastidären *petA*-Gens ist beschrieben

(Monde et al. 2000a), dass bei der Southern-Analyse keine Wildtyp-Fragment mehr detektiert werden konnten. Jedoch wurden auch nach mehreren Zyklisierungsschritten Signale bei der spezifischen PCR-Amplifikation des *petA*-Gens erhalten. Die nicht detektierbaren „Wildtyp"-Fragmente in der Arbeit von Monde et al. (2000a) könnten z.B. anhand der geringeren Menge an eingesetzter DNA für die Southern-Analyse erklärt werden oder aufgrund von Unterschieden in der Detektions-Sensitivität. Zusätzliche Hinweise, dass die in dieser Arbeit erzeugten Δ*petA*-Mutanten homoplastomisch für die Deletion waren, zeigte die Southern-Analyse mutanter und rekonstituierter Linien (siehe Abb. 3.5, Seite 55). In allen analysierten Linien war die oben erwähnte schwache Bande mit der selben Intensität sichtbar. Das lässt den Rückschluss zu, dass diese detektierten DNA-Fragmente nicht plastidären Ursprungs sind, da zu erwarten gewesen wäre, dass die Anzahl an Wildtyp- und rekonstituierten Plastommolekülen in gleichem Maß zugenommen hätte. Des weiteren konnten unter Verwendung der Sonde P3 (siehe Abb. 3.7, Seite 63) für den Nachweis der *petA*-Deletion und -Rekonstitution keine Banden detektiert werden, die der Größe nach der Wildtyp-DNA entsprachen. Dies Ergebnisse resultierten aus der Southern-Analyse von Gesamt-DNA aus rekonstituierten markerfreien T1-Keimlingen (siehe Abb. 3.8F, Seite 66) und bestätigte, dass es sich bei den in einigen Fällen detektierten schwachen Banden höchstwahrscheinlich nicht um plastidäre DNA-Fragmente handelte.

Neben der Gewissheit des homoplastomischen Zustands der Δ*petA*-Pflanzen für die Rekonstitutionsexperimente ist es ebenfalls von Bedeutung, die mutanten Linien langfristig zur Verfügung zu haben. Die Erhaltung von Kallus- und Spross-Kulturen *in vitro* ist auf lange Sicht unerwünscht, da es aufgrund somaklonaler Veränderungen zu abnormalen Phänotypen oder einer reduzierten Fertilität kommen kann (Larkin und Scowcroft 1981). In der hier beschriebenen Arbeit wurde eine heteroplastomische, deutliche segregierende Δ*petA*-Linie in Erde gepflanzt und für die Samen-Produktion ins Gewächshaus gestellt. Da sich die Segregation von mutantem und Wildtyp-Plastom zufällig abspielt, entstehen Seitentriebe, die zum Teil chimär, zum Teil aber auch homoplastomisch für die *petA*-Deletion sind. Von Blüten dieser homoplastomischen Seitentriebe konnten Samen gewonnen werden, deren Keimlinge einen homoplastomischen Δ*petA*-Phänotyp aufwiesen und daher als Ausgangsmaterial für Rekonstitutionsexperimente zur Verfügung standen. Dieser Ansatz zur Herstellung von Samen heterotropher Mutanten ist vergleichbar mit der

Samenproduktion *rpoB*-deletierter Mutanten. Wie in der Arbeit von Allison et al. (1996) beschrieben, wurden Samen einer variegierenden Periklinal-Chimäre gewonnen, die zuvor auf eine Wildtyp-Pflanze gepfropft worden war.

In vergleichbaren Ansätzen zur Deletion und Rekonstitution des *petA*-Gens wurden von F.-C. Huang (ICON Genetics, Arbeitsgruppe Freising) auch die plastidär-kodierten Gene *ycf3* und *rpoA* deletiert und rekonstituiert (Klaus et al. 2002). Auch diese beiden plastidären Mutanten wiesen im homoplastomischen Zustand einen spezifischen Phänotyp, der zur Phänotyp-unterstützten Selektion in Rekonstitutionsexperimenten geeignet war. Vor allem die Rekonstitution des ausgeprägten Albino-Phänotyps - typisch für die Deletion des *rpoA*-Gens wie auch für die Deletion aller anderen Untereinheiten (*rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2*) der plastidär-kodierten RNA-Polymerase (Allison et al. 1996, De Santis-Maciosek et al. 1999) - eignete sich gut für die frühe Erkennung plastidärer Transformanten. Verglichen mit der Rekonstitution von Δ*petA*- und Δ*ycf3*-Mutanten waren *rpoA*-rekonstituierte Regenerate aufgrund der besseren Differenzierbarkeit zwischen mutantem (weiß) und rekonstituiertem (grün) Pflanzengewebe optisch noch einfacher zu selektieren. Des weiteren konnte neben dem Beschuss von Δ*rpoA*-Mikrokolonien auch die Verwendung von Blättern für die ‚particle gun'-Transformation etabliert werden, die zudem die höchste Transformations-effizienz aller Rekonstitutionsexperimente aufwies (Klaus et al. 2002).

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Rekonstitution eines zuvor deletierten plastidären Tabak-Gens grundsätzlich möglich ist und zur Produktion definitiver Plastidentransformanten unter Zuhilfenahme eines Phänotyp-unterstützten Selektionssystems eingesetzt werden kann. Die Verwendung *petA*-defizienter Tabaklinien zur Herstellung plastidärer Transformanten kann auch zur Integration weiterer Gene neben dem *aphA-6*-Gen als Marker verwendet werden. Homoplastomische Δ*petA*-Pflanzen müssen dabei nur einmal hergestellt werden und können dann - aufrechterhalten als *in vitro*-Kultur oder Samen - für jegliche Experimente zur Transformation des Chloroplasten-genoms eingesetzt werden. Die Rekonstitution des *petA*-Gens unter Verwendung des *aphA-6*-Gens als Selektionsmarker sollte erst grundsätzlich gezeigt werden, um diese Methode dann zur Herstellung markerfreier Plastidentransformanten einzusetzen. Zudem wurde mit der Deletion und darauffolgenden Rekonstitution des *petA*-Gens erstmals die aufeinanderfolgende Verwendung zweier verschiedener Plastidenmarker gezeigt.

4.3 Neue Erkenntnisse über die Rekombination in Chloroplasten

Es wird im Allgemeinen angenommen, dass die Integration von Fremd-DNA in das plastidäre Genom über den Mechanismus der doppelt-reziproken Rekombination erfolgt. Dabei können mit Hilfe zweier homologer Bereiche (Flanken) dazwischen plazierte DNA-Sequenzen in das Plastom integriert werden (Maliga et al. 1994). Jedoch fehlen in der Literatur genaue Beschreibungen des zugrundeliegenden Mechanismus. Die effiziente Integration von Fremd-DNA in das plastidäre Genom beruht generell auf der großen Rekombinationsaktivität in Chloroplasten (Goulding et al. 1996). Pflanzlichen Zellorganellen fehlt der Vorteile der sexuellen Fortpflanzung aufgrund ihrer vorwiegend uniparentalen Vererbung. Diese als eine Art asexuelle Reproduktion zu bezeichnende Vermehrung kann das Auftreten unerwünschter Mutationen deutlich erhöhen (Lynch und Blanchard 1998). Des weiteren unterliegen die Chloroplasten und damit deren Erbgut einem starken oxidativem Stress bedingt durch die Photooxidation. Es wird daher angenommen, dass eine hohe inter- und intramolekulare Rekombination diesen Problemen entgegenwirken könnte (Cerutti et al. 1995). Wie an Beispielen von *Arabidopsis* und Erbse (*Pisum sativum*) gezeigt werden konnte, existieren große Homologien zwischen dem Kern-kodierten, aber Plastiden-lokalisierten RecA-Protein und dem RecA-Protein von *Escherichia coli* (Cerutti et al. 1992, 1993, Pang et al. 1992, Cao et al. 1997). Diese Ergebnisse legten nahe, dass die plastidäre Rekombination unter Beteiligung ursprünglich prokaryotischer Rekombinationsenzyme abläuft. Daher wird davon ausgegangen, dass bei der Chloroplasten-Transformation die Integration neuer DNA-Sequenzen durch eine doppelte ‚cross over'-Rekombination über die beiden homologen Flanken erfolgt. Für den Fall, dass nur eine homologe Flanke für die Rekombination zur Verfügung steht, wäre es vorstellbar, dass der gesamte Transformationsvektor unter Verdoppelung der homologen Flanke in das Plastom integriert. Dies konnte erstmals anhand eines plastidären DNA-Fragments (NICE1-Element) gezeigt werden, welches nachweislich unter Sequenzverdopplung zur reversiblen Integration des gesamten Transformationsvektors führte (Staub und Maliga 1994a, Staub und Maliga 1995b).

Die reversible Integration von DNA über eine Flanke vermittelt durch homologe Rekombination ist ein weit verbreiteter Mechanismus bei Bakterien (zusammengefasst in Suzuki et al. 1991, Stryer 1995). Die zirkuläre DNA des Bakteriophagen Lambda integriert über spezifische homologe Bereiche (‚attachment sites', *attP*) in das Genom von *E.coli* um

in den lysogenen Zustand des Prophagen zu treten. Vergleichbar läuft auch die Insertion von Episomen in das Chromosom von *E.coli* ab. Ein bekanntes Episom ist der bakterielle F-Faktor (Fertilitätsfaktor), der über ein Flanke ins bakterielle Genom integriert und dem jeweiligen Bakterium die Fähigkeit zur Konjugation (Weitergabe des F-Faktors) verleiht. In den beiden beschriebenen Fällen ist der Prozess der Integration reversibel: Erfolgt die Exzision der Lambda-DNA kommt es zur Lysogenie, erfolgt das Herausrekombinieren des F-Faktors, ermöglicht dies die Weitergabe des Episoms an nicht fertile *E.coli*-Bakterien.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Standardvektoren für die Plastidentransformation jeweils auch als Ganzes über eine der beiden homologen Flanken in das plastidäre Genom integrieren. Dass die Integration über eine Flanke immer zuerst erfolgt, bevor dann über die zweite Flanke das Rückgrat des Transformationsvektors wieder herausrekombiniert und somit die stabile Integration fremder DNA einhergeht, ist wahrscheinlich, bleibt jedoch spekulativ. Die Ergebnisse zeigten auch, dass bei gleichem Analysezeitpunkt manche Linien den gesamten Vektor nur über die eine oder andere Flanke integriert hatten, manche Linien jedoch schon stabil transformiert waren. In Ausnahmefällen konnte eine längerfristige Erhaltung von Vektormolekülen in plastidären Transformanten beobachtet werden, verbunden mit einer Zunahme an Vektormolekülen pro Chloroplast. Dies kann damit erklärt werden, dass der Transformationsvektor unter gewissen Umständen länger im Plastom integriert bleibt. Wird so ein nahezu homoplastomischer Zustand erreicht und kommt es dann erst zu Rekombinations-ereignissen, bei denen das Vektorrückgrat oder aber der Transformationsvektor herausrekombiniert, können größere Mengen an Vektor-DNA in Chloroplasten auftreten. Dieses Phänomen tauchte erstmals bei einer plastidären Transformante auf, bei der der plastidäre Replikationsursprung B (*oriB*) deletiert worden war. Wie in dem in Abschnitt 3.4 beschriebenen Bespiel der *petA*-deletierten Linie 65-38 konnten auch bei der plastidären ‚*oriB*'-Deletionsmutante größere Mengen an Plasmid-DNA bei der Southern-Analyse detektiert werden (mündliche Mitteilung, S. Mühlbauer, ICON Genetics). Auch in darauffolgenden Experimenten konnte der Beweis geliefert werden, dass es sich bei der detektierten DNA um den eingesetzten Transformationsvektor handelt, welcher mit Hilfe von Bakterien-Transformation aus der Gesamt-DNA isoliert worden war. Schon früher konnte gezeigt, dass unter gewissen Umständen extrachromosomale Plasmide in Chloroplasten über einen gewissen Zeitraum stabil existieren können (Staub und Maliga 1994a, Staub und Maliga 1995b). Das zirkuläres DNA-Molekül NICE1 konnte aufgrund

der großen Anzahl an Molekülen selbst in Southern-Analysen detektiert werden. In weiteren Experimenten war es möglich, Transformationsvektoren mit einem integrierten NICE1-Element für die Re-Isolation von Markergenen (‚marker rescue') aus plastidären Transformanten einzusetzen (Staub und Maliga 1995b) und diese dabei als ‚shuttle'-Vektoren zwischen Chloroplasten und *E.coli* zu verwenden.

Die neuen Erkenntnisse über den generellen Ablauf der Insertion von Fremd-DNA in das plastidäre Genom führten zu der Idee, die vorübergehende Integration des gesamten Transformationsvektors für eine kurzzeitige Expression eines Antibiotika-Resistenzmarkers zu verwenden, ohne diesen langfristig stabil ins Plastom zu integrieren. Dafür wurde das *aphA-6*-Gen in das Rückgrat eines Rekonstitutionsvektors kloniert, so dass der Antibiotika-Resistenzmarker nicht stabil in das plastidäre Genom integriert werden kann.

4.4 Mixotrophe Bedingungen zur Selektion plastidärer Transformanten

Die Abwesenheit von Antibiotika-Resistenzmarkern und anderen Selektionsmarkern wäre für die Verwendung transgener Pflanzen in der Landwirtschaft und für die Produktion biotechnologisch wichtiger Proteine in diesen Pflanzen grundsätzlich zu begrüßen. Gerade im Hinblick auf öffentliche Bedenken und zur Verhinderung der Verbreitung solcher Resistenzgene ist es - neben der Notwendigkeit der Marker für die Selektion transgener Pflanzen - auch von großem Interesse, diese später wieder zu entfernen. In Anbetracht dessen sollte die Methode der Deletion und Rekonstitution des *petA*-Gens für die Herstellung markerfreier Plastidentransformanten verwendet werden. Dabei sollte in Rekonstitutionsexperimenten das re-integrierte *petA*-Gen als Marker dienen. Um rekonstituierte Regenerate selektieren zu können, sollten geeignete mixotrophe oder autotrophe Selektionsbedingungen etabliert werden. Die Methode der Komplementation von Defektmutanten war die Grundlage für die ersten stabilen Chloroplasten-Transformationen in der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton et al. 1988, Blowers et al. 1989, Kindle et al. 1991). In diesen Experimenten wurden photosynthetisch inaktive Δ*atpB*-Mutanten mit Mikroprojektilen beschossen, die DNA-

Konstrukte mit einer Wildtyp-Kopie des *atpB*-Gens trugen. Durch die stabile Integration des *atpB*-Gens in das plastidäre Genom waren transformierte Zellen zu autotrophem Wachstum befähigt, während nicht transformierte Zellen nicht regenerationsfähig waren. Im Vergleich zur nachträglichen Entfernung des Antibiotikum-Resistenzmarkers aus transplastomen Pflanzen (Iamtham und Day 2000, Corneille et al. 2001, Hajdukiewicz et al. 2001) erschien diese Methode, den Selektionsmarker erst gar nicht in die Pflanze einzubringen, als die beste Lösung. Des weiteren eröffnete diese Komplementationstechnik auch die Möglichkeit, zusätzlich Gene neben dem re-inserierten *petA*-Gen ins Plastom zu integrieren. Bis heute gibt es keine Berichte über die Rekonstitution Photosynthese-defizienter Mutanten in höheren Pflanzen unter Verwendung des fehlenden Photosynthesegens als Selektionsmarker. Auch in dieser Arbeit war die Verwendung des *petA*-Gens als ausschließlicher Marker für die Selektion rekonstituierter Regenerate nicht erfolgreich. Neben der geringen Anzahl an Experimenten kann dies auch mit zu wenig angepassten Selektionsbedingungen erklärt werden. Die verwendeten mixotrophen Selektionsbedingungen (Reduktion des Zuckergehalts im RMOP-Medium von 3 % auf 0,25-1,25 %) basierte ausschließlich auf Ergebnissen einer Testreihe mit Wildtyp und Δ*petA*-Mutanten. Die Verwendung von Zucker-freiem Medium, wie es in den Komplementations-Experimenten bei *Chlamydomonas* verwendet wurde (HS Minimal-Medium nach Sueoka 1960), kam in Rekonstitutionsexperimenten nicht zum Einsatz, da Blattgewebe von Δ*petA*-Mutanten unter diesen Umständen sehr schnell abstarb. Erklärungen, warum die photosynthetische Selektion bei *Chlamydomonas* funktioniert, dies aber nicht in den Experimenten zur Rekonstitution des *petA*-Gens der Fall war, können zudem folgende sein: Neben den Unterschieden bezüglich des Selektionsmediums könnte auch ein erhöhter CO_2-Gehalt der Luft die Selektion photosynthetisch-aktiver Zellen erleichtern, wie er für die Anzucht transplastomer *Chlamydomonas*-Zelllinien verwendet wurde (Boynton et al. 1988). Des weiteren könnte die Selektion auch durch die Tatsache erleichtert gewesen sein, dass *Chlamydomonas*-Zellen nur einen Chloroplasten haben, der in komplementiertem Zustand die gesamte Zelle photosynthetisch mit Energie versorgen kann. Dies steht in direktem Kontrast zu höheren Pflanzen, wo Blattzellen bis zu 100 Chloroplasten enthalten (Bendich 1987, Bogorad 2000). Aus diesem Grund könnte die photosynthetische Energiegewinnung durch einige wenige Chloroplasten nicht ausreichend für die Regenerationsfähigkeit rekonstituierter Zellen sein. Auch die Lichtstärke, bei der die photosynthetische Selektion durchgeführt wird, könnte Einfluss auf die Selektion haben. Jedoch waren in diesem Punkt nur geringfügige Abweichungen zwischen den

publizierten und den hier beschriebenen Experimenten zu verzeichnen. Sowohl bei Schwachlichtbedingungen (3 bzw. 5 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) als auch bei Starklichtbedingungen (80 bzw. 70 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) waren die Werte bei Boynton et al. (1988) mit unseren Kulturbedingungen vergleichbar.

4.5 Herstellung markerfreier Plastidentransformanten

4.5.1 Verbreitung von Transgenen

Der Einsatz markerfreier transgener Pflanzen ist in der Landwirtschaft und Biotechnologie grundsätzlich erwünscht, um eine mögliche Verbreitung von Antibiotika-Resistenzmarkern zu vermeiden. Dies trifft neben Kerntransformanten auch auf transplastome Linien zu, obwohl bei diesen die Gefahr der Verbreitung des Transgens durch den Pollen nur auf wenige Pflanzenarten zutrifft (Corriveau und Coleman 1988), weswegen Chloroplasten-Transformanten als „biologisch sicherer" gelten (Maliga 1993, Daniell et al. 1998, Scott und Wilkinson 1999, Daniell et al. 2002b). Dennoch sind Selektionsmarker generell und im Besonderen Antibiotika-Resistenzgene in transplastomen Pflanzen wie auch in Kerntransformanten nach der Selektion nutzlos und somit überflüssig. Aus diesem Grund stellt auch das in der Chloroplasten-Transformation jüngst eingesetzte *badh*-Gen keinen entscheidenden Durchbruch dar. In der Veröffentlichung von Daniell et al. (2001a) wurde erstmals die Selektion plastidärer Transformanten ohne Verwendung eines Antibiotikum-Resistenzgens beschrieben. Dieser Ansatz vermeidet zwar die Verwendung eines Antibiotikum-Resistenzmarkers zur Selektion, löst jedoch nicht das Problem, dass der Selektionsmarker als solcher nach der Transformation keinen Nutzen mehr in den transgenen Pflanzen hat und zudem Energie für seine Expression aufgewendet werden muss.

Der horizontale Gentransfer

Es gibt auch noch einen weiteren wichtigen Aspekt, solche Markergene aus transgenen Pflanzen zu entfernen. Auch wenn es bis heute keine eindeutigen Ergebnisse gibt, die einen horizontalen Gentransfer (HGT) von transgenen Pflanzen zu Mikroorganismen bestätigen, so gibt es doch Hinweise, die dies nicht unmöglich erscheinen lassen. Gerade in

den letzten Jahren, und vor allem in Europa, standen oft die tatsächlichen Probleme Antibiotika-resistenter Mikroorganismen (Salyers 1996, Brickner 1997) im Hintergrund verglichen mit der generellen Ablehnung genetisch veränderter Pflanzen und dem damit verbundenen möglichen HGT. Erste wissenschaftliche Untersuchungen des deutschen Bundesministeriums für Forschung und Technologie (Becker et al. 1994) und der amerikanischen ‚Food and Drug Administration' (Maryanski 1995) konnten, wie andere wissenschaftliche Gruppen (Schlüter et al. 1995, Broer et al. 1996, Nielsen et al. 1997, Dröge et al. 1998, Syvanen 1999, Smalla et al. 2000), keine eindeutigen Hinweise für den möglichen Transfer von Antibiotika-Resistenzgenen aus transgenen Pflanzen in Bakterien finden. Es ist jedoch bekannt, dass ein HGT zwischen Bakterien und Pilzen stattfinden kann (Stewart und Sinigalliano 1990), was mit der evolutionsgeschichtlich nahen Verwandtschaft zu erklären ist. Die Aufnahme von pflanzlicher DNA durch Boden- und Pflanzenbakterien steht in Abhängigkeit der Persistenz der freien DNA in der Erde und der grundsätzlichen DNA-Aufnahmefähigkeit (Kompetenz) dieser Organismen. So konnte in verschiedenen Experimenten gezeigt werden, dass freie DNA in Erde sehr schnell degradiert, jedoch geringe Mengen auch noch nach mehreren Monaten nachweisbar sind (Widmer et al. 1996, 1997, Gebhard und Smalla 1999). Erstmals konnte bei einem *Acinetobacter*-Stamm unter optimierten Laborbedingungen die Fähigkeit eines Bakteriums gezeigt werden, pflanzliche DNA aus der Erde aufzunehmen und stabil ins Genom zu integrieren. Dies war jedoch nur möglich, wenn der *Acinetobacter*-Stamm bereits DNA-Sequenzen im Genom integriert hatte, die homolog zu der pflanzlichen DNA waren. Auf diese Weise konnte auch die Integration von DNA-Fragmenten aus verschiedenen transgenen Pflanzenarten (Kartoffel, Zuckerrübe, Raps, Tomate und Tabak) über homologe Rekombination nachgewiesen werden (Gebhard und Smalla 1998, De Vries und Wackernagel 1998). Jedoch war die Kompetenz, mit der die Aufnahme freier DNA durch den *Acinetobacter*-Stamm erfolgte, äußerst gering und dürfte in der freien Natur noch weit geringer sein.

Auch wenn bei den hier aufgeführten Bespielen zu Untersuchungen von HGT zwischen Pflanzen und Mikroorganismen immer Kern-transformierte Pflanzen herangezogen wurden, so sollten diese Ergebnisse auch auf plastidär-veränderte Pflanzenarten zutreffen. Erste Hinweise dafür konnten in Experimenten von Kay et al. (2002) gewonnen werden, bei denen der HGT des *aadA*-Gens von transplastomen Chloroplasten auf einen *Acinetobacter*-Stamm ebenfalls nur in Abhängigkeit von Plastiden-homologen DNA-Bereichen stattfand, die zuvor in das Bakterium integriert worden waren. Der Transfer von

Chloroplasten-DNA in Mikroorganismen könnte aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft - beruhend auf der Endosymbiontentheorie (Schimper 1883, Mereschkowski 1905, 1910) - sogar erleichtert sein. Verglichen mit kerntransformierten Pflanzen könnte zudem die deutlich höhere Transgen-Kopienzahl in Plastidentransformanten die Möglichkeit eines HGT erhöhen. Auch der prokaryotisch organisierte Expressionsapparat könnte die Exprimierbarkeit aufgenommener Gene in Bakterien erleichtern. Es gibt jedoch auch Anzeichen, dass auch eukaryotische Promotoren eine hohe Aktivität in Mikroorganismen aufweisen können (Yim 2000).
Grundsätzlich darf jedoch die Tatsache nicht außer acht gelassen werden, dass Antibiotika-Resistenzgene, die zudem meist in Verbindung mit mobilen genetischen Elementen auftreten (Tschäpe 1994, Salyers und Shoemaker 1994, Witte 1998), in der mikrobiellen Welt weit verbreitet sind und ständig weiter verbreitet werden. Dagegen ist die - wenn überhaupt mögliche - Verbreitung dieser Gene von transgenen Pflanzen auf Mikroorganismen ein nahezu vernachlässigbarer Faktor. Vielmehr sollte auf dem medizinischen und landwirtschaftlichen Sektor der übermäßige Einsatz und Missbrauch von Antibiotika vermieden werden, was letztendlich die dramatische Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen entscheidend gefördert hat (Salyers 1996, Witte 1998).

Verbreitung über den Pollen

Von ebenso großer Bedeutung wie die Verhinderung des horizontalen Gentransfers ist es auch, die Verbreitung jeglicher Transgene über den Pollen auf Wildtyp-Pflanzen oder nah verwandte Arten zu unterbinden. Dies ist kein Problem, wenn transgene Nutzpflanzen in Gegenden angebaut werden, in denen die entsprechenden Wildtyparten nicht vorkommen. Wenn jedoch im Verbreitungsbereich des Pollens Wildtyp-Pflanzen oder nah verwandte Arten wachsen, kann eine Verbreitung des Transgen über den Pollen nicht ausgeschlossen werden. Auch wenn der Verbreitungsbereich von Pollen artenabhängig ist und Studien zufolge nur in seltenen Fällen mehrere Kilometer beträgt (Squire et al. 1999, Staniland et al. 2000, Eastham und Sweet 2002), so ist die Gefahr der Kreuzung mit Wildtyplinien nicht zu vernachlässigen. Dies trifft vor allem auf die landwirtschaftlich weit verbreiteten *Brassica*-Arten wie verschiedene Rapsarten/Canola (*Brassica napus*), Rübsenarten (*Brassica rapa*) und den Ackersenf (*Sinapis arvensis*) zu, bei denen neben der hohen Kreuzungsrate die entstehenden Hybride meist auch fertil sind (Sheffler et al. 1993, Sheffler und Dale 1994, Sheffler et al. 1995, Timmons et al. 1995, Bing et al. 1996). Daher war es auch nicht erstaunlich, dass Transgene aus landwirtschaftlich genutzten,

gentechnologisch veränderten *Brassica*-Arten in Wildtyp-Pflanzen und nah verwandten Arten detektiert werden konnten (Mikkelsen et al. 1996, Metz et al. 1997, Chèvre 2000). Auch die ‚Verunreinigung' nicht transgener Canola-Samen mit einem nicht genehmigten Transgen konnte durch Pollentransfer erklärt werden (Smyth et al. 2002), genauso wie die Entstehung einer dreifach-herbizidresistenten Canola-Art in Großanbaugebieten der USA und Kanada, die nie gentechnisch hergestellt worden war (MacArthur 2000). Selbst im auf diesem Gebiet vergleichbar konservativen Europa kam es zu einem Vorfall, bei dem in der Schweiz in einer nicht gentechnisch veränderten Maissorte das *Bt*-Gen aus *Bacillus thuringiensis* nachgewiesen werden konnte, welches Resistenz gegen den Schädling Maiszünsler vermittelt (Fürst 1999).

Probleme verbunden mit der Verbreitung von Transgenen sind bis heute nur bei Kern-transformierten Nutzpflanzen aufgetreten. Transplastome Pflanzen haben zwar den Vorteil der maternalen Vererbung des Transgens, die eine Verbreitung über den Pollen verhindert. Die genetische Veränderung von Nutzpflanzen auf der Chloroplastenebene ist jedoch noch nicht soweit fortgeschritten, dass dies landwirtschaftlich eine Rolle spielen würde. Neben der maternalen Vererbung des Transgens bei transplastomen Pflanzen könnte der Gentransfer über den Pollen auch bei Kern-transformierten Pflanzen unter Verwendung verschiedener Methoden grundsätzlich unterbunden werden (männliche Sterilität, Samen-Sterilität, Kleistogamie u.a., zusammengefasst in Daniell 2002b).

4.5.2 Markerfreie Chloroplasten-Transformanten

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode zur Herstellung markerfreier Plastiden-transformanten besticht gerade in dem Punkt, dass der Selektionsmarker, das *aphA-6*-Gen, nur kurzzeitig und nicht stabil ins Plastom integriert wird. Das unterscheidet diese Methode von allen anderen Ansätzen, mit deren Hilfe das Markergen aus transplastomen Pflanzen entfernt wurde. Beim Rekombinations-vermittelten Herausschneiden von Gensequenzen zwischen identischen Sequenzwiederholungen (‚direct repeats') wird das Markergen zusammen mit anderen Genen zunächst stabil in das Plastom integriert. Aufgrund intrachromosomaler Rekombinationsereignisse kommt es aber - vergleichbar mit dem Hinein- und Herausrekombinieren des gesamten Transformationsvektors über eine Flanke - zum Herausschneiden des Markergensequenz (Fischer et al. 1996, Iamtham und Day 2000). Ein Nachteil dieses Ansatzes ist es, dass die Rekombinations-vermittelte Entfernung des Markergens auch im heteroplastomischen Zustand stattfinden kann, was

das Erreichen des homoplastomischen Zustands erschwert. Die Rekonstitution des *petA*-Gens zur Herstellung markerfreier transplastomer Pflanzen hat den klaren Vorteil gegenüber der ‚direct repeat'-Methode, dass der homoplastomische Zustand hier äußerst schnell erreicht wird.

Eine bis heute nur für *Chlamydomonas* beschriebene Methode der Markerentfernung beruht auf der Deletion eines essentiellen Plastidengens, in die der Selektionsmarker integriert wird. Der homoplastomische Zustand eines gleichzeitig durch Co-Transformation integrierten Gens kann erreicht werden, obwohl der homoplastomische Zustand für den Selektionsmarker nie erreicht wird (Fischer et al. 1996). Ein Grund, warum dieser Ansatz nie auf höhere Pflanzen übertragen werden konnte, könnte an der Anzahl an Chloroplasten pro Pflanzenzelle bzw. Anzahl an Plastommolekülen pro Chloroplast liegen. Verglichen mit der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii*, die nur einen Chloroplast pro Zelle mit etwa 50-80 plastidären Genomen aufweist, besitzen die Mesophyllzellen höherer Pflanzen bis zu 100 Chloroplasten, und jeder einzelne Chloroplast ebenfalls bis zu 100 Plastommoleküle (Bendich 1987, Bogorad 2000). Aufgrund dieser Tatsache erscheint diese Methode zur Herstellung markerfreier Plastidentransformanten in höheren Pflanzen eher kompliziert und auch fragwürdig, was die grundsätzliche Durchführbarkeit betrifft. Zudem weist sie ebenfalls den Nachteil auf, dass erst mehrere Regenerationszyklen notwendig sind, um transplastome Linien homoplastomisch für das neutral integrierte Gen zu bekommen, bevor dann weitere Regenerationszyklen notwendig sind, um das Antibiotikum-Resistenzgen wieder zu entfernen. Auch hier zeigt sich wieder der große Vorteil der *petA*-Rekonstitution zur Herstellung markerfreier Chloroplasten-Transformanten: das *aphA-6*-Gen wurde erst gar nicht stabil in das plastidäre Genom integriert.

Neben den beiden oben beschriebenen Ansätzen zur Entfernung des Markergens aus Chloroplasten wurde kürzlich ein weiteres System beschrieben, bei dem eine zur Entfernung von Markergenen aus Kerntransformanten verwendete Methode zum Einsatz kam. Das aus dem Bakteriophagen P1 stammende Cre/*lox*-System ist eine weitverbreitete Methode zur Herstellung markerfreier Kern-transformierter Pflanzen (Dale und Ow 1991, Russell et al. 1992, Ow und Medberry 1995, Srivastava et al. 1999). Die Anwendbarkeit dieses Systems auf plastidärer Ebene, bei der die Entfernung des Markergens auf eine stark erhöhte Anzahl an Genkopien übertragen werden muss, konnte kürzlich in zwei Veröffentlichungen gezeigt werden (Corneille et al. 2001, Hajdukiewicz et al. 2001). In der

Arbeit von Corneille et al. (2001) wurde neben dem *aadA*-Gen auch das *codA*-Gen ins plastidäre Genom von Tabak integriert, welches zwischen spezifische 34 bp kurze *lox*-Erkennungssequenzen kloniert worden war und für eine Cytosin-Deaminase (CD) codiert. Homoplastomische Linien wurden mit Tabakpflanzen gekreuzt, die das *cre*-Gen mit N-terminaler Chloroplasten-Importsequenz stabil im Kern integriert hatten. In allen Cre-positiven T1-Keimlingen konnte der partielle oder vollständige Verlust des ‚negativen Selektionsmarkers' *codA* detektiert werden. Die Entfernung des *codA*-Gens konnte auch anhand des Phänotyps der Keimlinge unter Einwirkung von 5-Fluorocytosin (5FC) gezeigt werden. Keimlinge, die das *codA*-Gen nicht mehr integriert hatten, zeigten einen 5FC-resistenten grünen Phänotyp, während Keimlinge mit integriertem *codA*-Gen aufgrund der CD-vermittelten Umwandlung von 5FC zu 5-Fluorouracil, dem Vorläufer des toxischen 5-Fluoro-dUMP, sensitiv waren und ausblichen (Serino und Maliga 1997). Auch in dem zweiten Beispiel (Hajdukiewicz et al. 2001) wurde die Entfernung eines zuvor stabil ins Plastom integrierten Gens mit einem optisch detektierbaren Marker kombiniert. Homoplastomische Tabaklinien mit einem exprimierten *aadA*-Gen und einem nicht exprimierten *gfp*-Gen wurde unter Verwendung der „*Agrobacterium*-Transformation" das *cre*-Gen mit N-terminaler Chloroplasten-Importsequenz stabil in den Kern integriert. Cre-Aktivität in den Chloroplasten führte zur Deletion des *aadA*-Gens, was gleichzeitig den 16S rRNA-Promotor in direkte Nachbarschaft zur kodierenden Sequenz des *gfp*-Gens brachte. Dies hatte die Expression des *gpf*-Gens zur Folge, wodurch alle Regenerate, die keinen Antibiotika-Resistenzmarker mehr enthielten, anhand ihrer grünen Fluoreszenz leicht detektierbar waren.

Beide Ansätze zur Herstellung markerfreier Chloroplasten-Transformanten unter Verwendung des Cre/*lox*-Systems führten zum schnellen Verlust der Gensequenzen, die von *lox*-Erkennungssequenzen eingerahmt waren. Der schnelle Weg zur Homoplasmie in diesen transplastomen Tabakpflanzen ist vergleichbar mit der sehr schnellen Zunahme an markerfreien Plastommolekülen in *petA*-rekonstituierten Linien. Ein deutlicher Nachteil des Cre/*lox*-Systems zur Entfernung des Markergens ist jedoch die Notwendigkeit mehrerer Transformations- und Segregationsschritte, um letztendlich markerfreie transplastome Pflanzen zu erhalten: Nach der Integration von Gensequenzen in das plastidäre Genom müssen Transformanten erst mit Hilfe mehrerer Regenerationszyklen homoplastomisch gemacht werden. Dem folgt ein weiterer Transformationsschritt, mit dessen Hilfe das *cre*-Gen in den Kern integriert wird. Regenerate Cre-positiver Linien sind zwar nun markerfrei, das Kern-kodierte *cre*-Gen muss aber nun erst noch ausgekreuzt

werden. Verglichen damit erscheint die Deletion und nachfolgende Rekonstitution des *petA*-Gens sehr viel einfacher und ist zudem deutlich weniger zeitaufwendig. Pflanzenlinien mit *petA*-Deletion müssen nur einmal hergestellt werden und können dann immer wieder in Rekonstitutionsexperimenten eingesetzt werden, bei denen jegliche erwünschte Gene integriert werden können. Markerfreie plastidäre Transformanten können daher unter Verwendung der Mutanten-Rekonstitution mit Hilfe eines einzigen Transformationsschritts hergestellt werden. Auch die Integration weiterer Gene an einer anderen Insertionsstelle kann mit Hilfe der Co-Transformation erreicht werden (mündliche Mitteilung, F.-C. Huang, ICON Genetics), womit man in Rekonstitutionsexperimenten nicht ausschließlich auf den Re-Insertionsort des *petA*-Gens festgelegt ist.

Eine Alternative der hier beschriebenen *petA*-Komplementationsmethode zur Herstellung markerfreier Plastidentransformanten stellt die Rekonstitution von weißen Δ*rpoA*-Mutanten dar. Rekonstituierte Regenerate sind nicht nur aufgrund ihrer guten Differenzierbarkeit zu nicht transformiertem weißen Gewebe einfach zu selektieren. Am Beispiel der *rpoA*-Rekonstitution konnte zudem gezeigt werden, dass erwartungsgemäß auch ohne die zusätzliche dritte Flanke (‚*trnN*'-Flanke) eine effiziente Herstellung markerfreier Chloroplasten-Transformanten möglich ist (mündliche Mitteilung, F.-C. Huang, ICON Genetics). Dies war nicht allzu überraschend, da bei der doppelt-reziproken Rekombination zur Re-Integration des *rpoA*-Gens der gesamte Rekonstitutionsvektor auch über eine Flanke ins plastidäre Genom integriert. Die kurzfristige Integration des gesamten Transformationsvektors in das plastidäre Genom konnte wiederum zur vorrübergehenden *aphA-6*-Expression verwendet werden, mit deren Hilfe rekonstituierte Regenerate selektiert werden konnten.

Die Etablierung der Chloroplasten-Transformation in landwirtschaftlich wichtigen Nutzpflanzen würde die zahlreichen Vorteile der Integration neuer Gene in das plastidäre Genom zum Tragen bringen. Neben der bereits erwähnten maternalen Vererbung des Plastoms, die eine Verbreitung des Transgens über den Pollen unterbindet, hat die Integration neuer Gene in das Chloroplasten-Genom weitere Vorteile. Dabei sind die punktgenaue Gen-Insertion, die Möglichkeit der polycistronischen Genexpression, das Fehlen von ‚gene silencing' und Positionseffekten sowie eine hohe Expression sowie die Akkumulierung exprimierter Protein zu erwähnen (Bock und Hagemann 2000, Bogorad 2000, Heifetz 2000, Maliga 2001, Daniell et al. 2002a, Maliga 2002). Die in dieser Arbeit

beschriebene Methode zur Herstellung markerfreier Chloroplasten-Transformanten bedeutet einen deutlichen Fortschritt, um die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzgenen im speziellen und von Transgenen generell zu vermeiden. Zudem ist das hier beschriebene System zur Erzeugung markerfreier Plastidentransformanten genauer vorhersehbar als andere Methoden. Auch wäre es vorstellbar, die Methode der Rekonstitution plastidärer Mutanten auf andere Pflanzenarten wie Kartoffel oder Tomate zu übertragen, bei denen die Plastidentransformation erfolgreich durchgeführt werden konnte (Sidorov et al. 1999, Ruf et al. 2001). Denn gerade in Kombination mit der visuell-unterstützten Selektion gewinnt die Mutanten-Rekonstitution zusätzlich an Attraktivität, da bereits in einem frühen Regenerationsstadium erkennbar ist, welche Regenerate transformiert sind und welche nicht. Neben der Phänotyp-unterstützten Selektion ist vor allem aber auch der schnelle Weg zum homoplastomischen Zustand ein entscheidender Vorteil. Bis auf wenige Ausnahmen waren alle *petA*-rekonstituierten Tabaklinien bereits nach kurzer Zeit und ohne jegliches Zyklisieren homoplastomisch für die *petA*-Re-Integration. Zudem konnte in der T1-Generation weder der Marker für die *petA*-Deletion (*aadA*) noch der Marker für die Rekonstitution (*aphA-6*) nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine neue Methode zur Herstellung markerfreier Chloroplasten-Transformanten etabliert. Als Voraussetzung dafür wurde die Verwendung des bakteriellen *aphA-6*-Gens als neuer plastidärer Marker und die Phänotyp-unterstützte Selektion *petA*-rekonstituierter Plastidentransformanten gezeigt. Zudem konnten neue Erkenntnisse bezüglich der Rekombination in Chloroplasten eingesetzt werden, welche eine vorrübergehende, nicht stabile Integration des *aphA-6*-Gens in Rekonstitutions-experimenten erlaubte. Auf diese Weise war es möglich, markerfreie Chloroplasten-Transformanten erstmals in einem Transformationsschritt und ohne zeitaufwendige Sprossregeneration herzustellen. Diese methodischen Fortschritte sollten die Weiterentwicklung der Plastidentransformation als analytische Methode und als Verfahren für biotechnologische Anwendungen unterstützen.

5 Literaturverzeichnis

Allison LA, Simon LD and Maliga P (1996) Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. EMBO J 15: 2802-2809

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (1999) Short protocols in molecular biology. Wiley Verlag (4th edition)

Ayliffe MA and Timmis JN (1992) Plastid DNA sequence homologies in the tobacco nuclear genome. Mol Gen Genet 236: 105-112

Barkan A, Miles D and Taylor WC (1986) Chloroplast gene expression in nuclear, photosynthetic mutants of maize. EMBO J 5: 1421-1427

Barkan A and Goldschmidt-Clermont M (2000) Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. Biochimie 82: 559-572

Barton KA and Chilton MD (1983) *Agrobacterium* Ti plasmids as vectors for plant genetic engineering. Methods Enzymol 101: 527-539

Barton KA, Binns AN, Matzke AJ and Chilton MD (1983) Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. Cell 32: 1033-1043

Bateman JM and Purton S (2000) Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: expression vectors and a new dominant selectable marker. Mol Gen Genet 263: 404-410

Baylay CC, Morgan M, Dale EC and Ow DW (1992) Exchange of gene activity in transgenic plants catalyzed by the Cre-*lox* site-specific recombination system. Plant Mol Biol 18: 353-361

Becker D, Brettschneider R and Lorz H (1994) Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. Plant J 5: 299-307

Becker J, Siegert H, Ligemann J und Schell J (1994) Begleitende Sicherheitsforschung zur Freisetzung genetisch veränderter Petunien. In: C Buchholz (Hsg.) Biologische Sicherheit. Bundesministerium für Forschung und Technologie, Bonn. Seiten 563-578

Bendich AJ (1987) Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? Bioessays 6: 279-282

Bevan MW, Flavell RB and Chilton MD (1983) A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304: 184-187

Bing DJ, Downey RK and Rakow G (1996) Assessment of transgene escape from *Brassica rapa* into *B. nigra* and *Sinapis arvensis*. Plant Breed 115: 1-4

Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7: 1513-1523

Blowers AD, Bogorad L Shark KB and Sanford JC (1989) Studies on *Chlamydomonas* chloroplast transformation: Foreign DNA can be stably maintained in the chromosome. Plant Cell 1: 123-132

Blowers AD, Ellmore GS, Klein U and Bogorad L (1990) Transcriptional analysis of endogenous and foreign genes in chloroplast transformants of *Chlamydomonas*. Plant Cell 2: 1059-1070

Bock R, Kössel H and Maliga P (1994) Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. EMBO J 13: 4623-4628

Bock R and Hagemann R (2000) Extranuclear inheritance: plastid genetics: manipulation of plastid genomes and biotechnological applications. In: Progress in Botany, Genetics, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Seiten 76-90

Bogorad L (2000) Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. Trends Biotechnol 18: 257-263

Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB and Sanford JC (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. Science 240: 1534-1537

Brickner SJ (1997) Multidrug-resistant bacterial infections: driving the search for new antibiotics. Chemistry and Industry, pages 125-131

Broer I, Dröge-Laser W and Gerke M (1996) Examination of the putative horizontal gene transfer from transgenic plants to agrobacteria. In: ER Schmidt, T Hankeln (Hsg.), Transgenic organisms and biosafety. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York. Seiten 67-70

Burrows PA, Sazanov LA, Svab Z, Maliga P and Nixon PJ (1998) Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. EMBO J 17: 868-876

Cao J, Combs C and Jagendorf AT (1997) The chloroplast-located homolog of bacterial DNA recombinase. Plant Cell Physiol 38: 1319-1325

Carrer H, Hockenberry TN and Maliga P (1993) Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. Mol Gen Gent 241: 49-56

Cerutti H, Osman M, Grandoni P and Jagendorf AT (1992) A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants. Proc Natl Acad Sci USA 89: 8068-8072

Cerutti H, Ibrahim HZ and Jagendorf AT (1993) Treatment of pea (*Pisum sativum* L.) protoplasts with DNA-damaging agents induces a 39-kilodalton chloroplast protein immunologically related to *Escherichia coli* RecA. Plant Physiol 102: 155-163

Cerutti H, Johnson AM, Boynton JE and Gillham NW (1995) Inhibition of chloroplast DNA recombination and repair by dominant negative mutants of *Escherichia coli* RecA. Mol Cell Biol 15: 3003-3011

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW and Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263: 802-805

Chèvre A-M, Eber F, Jenczweski E, Darmency H and Renard M (2000) Gene flow from rapeseed. In: Proceedings of the 6th international symposium on the biosafety of genetically modified organisms, Saskatoon, Canada; pages 45-50

Cornelissen MJ, De Block M, Van Montagu M, Leemans J, Schreier PH and Schell J (1987) Plastid Transformation: A progress report. In: Plant DNA infectious agents (Hohn T und Schell J, Ed.) Springer-Verlag Wien, Seiten 1367-1372

Cook WB and Miles D (1988) Transposon mutagenesis of nuclear photosynthetic genes in *Zea mays*. Photosynthesis Research 18: 33-59

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

Corriveau JP and Coleman AW (1988) Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. Am J Botany 75: 1443-1458

Dale EC and Ow DW (1991) Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. Gene 91: 79-85

Dale EC and Ow DW (1991) Gene transfer with subsequent removal of the selection marker from the host genome. Proc Natl Acad Sci USA 88: 10558-10562

Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S and Lee SB (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. Nat Biotechnol 16: 345-348

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

Daniell H, Lee SB, Panchal T and Wiebe PO (2001b) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. J Mol Biol 311: 1001-1009

Daniell H, Khan MS and Allison L (2002a) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. Trends Plant Sci 7: 84-91

Daniell H (2002b) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. Nat Biotechnol 20: 581-586

Davey MT, Rech EL and Mulligan BJ (1989) Direct DNA transfer to plant cells. Plant Mol Biol 13: 273-285

De Block M, Schell J and Van Montagu M (1985) Chloroplast transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J 4: 1367-1372

De Block M and Debrouwer D (1991) Two T-DNA co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium* infection are mainly integrated at the same locus. Theor Appl Genet 82: 257-263

De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M and Daniell H (2001) Overexpression of the *Bt cry*2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. Nat Biotechnol 19: 71-74

DeGray G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J and Daniell H (2001) Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. Plant Physiol 127: 852-862

De Santis-Maciossek G, Kofer W, Bock A, Schoch S, Maier RM, Wanner G, Rüdiger W, Koop H-U and Herrmann RG (1999) Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. Plant J 18: 477-489

De Vries J and Wackernagel W (1998) Detection of *nptII* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. Mol Gen Genet 257: 606-613

Dinkins RD, Bandaranayake H, Green BR and Griffiths AJ (1994) A nuclear photosynthetic electron transport mutant of *Arabidopsis thaliana* with altered expression of the chloroplast *petA* gene. Curr Genet 25: 282-288

Dovzhenko A, Bergen U and 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

Dovzhenko A (2001) Towards plastid transformation in rapeseed (*Brassica napus* L.) and sugar beet (*Beta vulgaris* L). Dissertation am Botanischen Institut der Fakultät für Biologie, Department I, Ludwig-Maximilians-Universität München

Drescher A, Ruf S, Calsa T Jr, Carrer H and Bock R (2000) The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. Plant J 22: 97-104

Dröge M, Pühler A and Selbitschka W (1998) Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern. J Biotechnol 64: 75-90

Dix PJ and Kavanagh TA (1995) Transforming the plastome: genetic markers and DNA delivery systems. Euphytica 85: 29-34

Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E and Yamakado M (1997) Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. Proc Natl Acad Sci USA 18: 2117-2121

Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Endo S, Yamada K and Komamine A (2001) Systems for the removal of a selectable marker and their combination with a positive marker. Plant Cell Reports 20: 383-392

Eibl C, Zou Z, Beck a, Kim M, Mullet J and 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 19: 333-345

Eastham K and Sweet J (2002) Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. Environmental Issue Report 28, European Environment Agency, Copenhagen, Denmark

Fischer N, Stampacchia O, Redding K and Rochaix JD (1996) Selectable marker recycling in the chloroplast. Mol Gen Genet 251: 373-380

Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL and Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. Proc Natl Acad Sci USA 80: 4803-4807

Frey PM, Scharer-Hernandez NG, Futterer J, Potrykus I and Puonti-Kaerlas J (2001) Simultaneous analysis of the bidirectional African cassava mosaic virus promoter activity using two different luciferase genes. Virus Genes 22: 231-242

Fromm ME, Morrish F, Armstrong C, Williams R, Thomas J and Klein TM (1990) Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. Biotechnology 8: 833-839

Fürst I (1999) Swiss soiled seed prompts tolerance question. Nat Biotechnol 17: 629

Fütterer J (1995) Enzyme assays for β-glucuronidase. In: Potrykus I, Spangenberg G (Hrsg.) Gene transfer in plants, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Seiten 72-85

Gamborg OL, Miller RA and Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50: 151-158

Gebhard F and Smalla K (1998) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. Appl Environ Microbiol 64: 1550-1554

Gebhard F and Smalla K (1999) Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. FEMS Microbiol Ecol 28: 261-272

Gleave AP, Mitra DS, Mudge SR and Morris BA (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: 223-235

Golds TJ, Maliga P and Koop H-U (1993) Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. Bio/Technology 11: 95-97

Goldsbrough AP, Lastrella CN and Yoder JI (1993) Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. Biotechnolgy 11: 1286-1292

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

Goulding SE, Olmstead RG, Morden CW and Wolfe KH (1996) Ebb and flow of the chloroplast inverted repeat. Mol Gen Genet 252: 195-206

Guba C, Lee SB and Daniell H (2000) Stable expression of a biodegradable protein-based polymer in tobacco chloroplasts. Plant Cell Reports 19: 257-262

Hager M, Biehler K, Illerhaus J, Ruf S and Bock R (1999) Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b_6/f complex. EMBO J 18: 5834-5842

Hager M, Hermann M, Biehler K, Krieger-Liszkay A and Bock R (2002) Lack of the small plastid-encoded PsbJ polypeptide results in a defective water-splitting apparatus of photosystem II, reduced photosystem I levels, and hypersensitivity to light. EMBO J 18: 5834-5842

Hajdukiewicz PT, Gilbertson L and Staub JM (2001) Multiple pathways for Cre/*lox*-mediated recombination in plastids. Plant J 27: 161-170

Haldrup A, Petersen SG and Okkels FT (1998) The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. Plant Mol Biol 37: 287-296

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166: 557-580

Hare PD and Chua NH (2002) Excision of selectable marker genes from transgenic plants. Nat Biotechnol 20: 575-580

Harris EH, Burkhart BD, Gillham NW and Boynton JE (1989) Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S and 23S rRNA genes of *Chlamydomonas reinhardtii*: correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome. Genetics 123: 281-292

Heifetz PB (2000) Genetic engineering of the chloroplast. Biochimie 82: 655-666

Hibberd JM, Linley PJ, Khan MS and Gray JC (1998) Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment. Plant J 16: 627-632

Hohn B, Levy AA and Puchta H (2001) Elimination of selection markers from transgenic plants. Curr Opin Biotechnol 12: 139-143

Hollingshead S and Vapnek D (1985) Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase. Plasmid 13: 17-30

Huang C, Ayliffe MA and Timmis JN, noch unveröffentlicht, Referenzdaten aus einem Vortrag von Prof. Timmis am Botanischen Institut der LMU, 17. Oktober 2002

Huang F-C, Klaus SMJ, Herz S, Zou Z, Koop H-U and Golds TJ (2002) Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection. Mol Genet Genomics 268: 19-27

Iamtham S and Day A (2000) Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. Nat Biotechnol 18: 1172-1176

Jach G, Binot E, Frings S, Luxa K and Schell J (2001) Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (dsRED) as a reporter for plant gene expression. Plant J 28: 483-491

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6: 3901-3907

Kavanagh TA, O'Driscoll KM, McCabe PF and Dix PJ (1994) Mutations conferring lincomycin, spectinomycin, and streptomycin resistance in *Solanum nigrum* are located in three different chloroplast genes. Mol Gen Genet 242: 675-680

Kavanagh TA, Thanh ND, Lao NT, McGrath N, Peter SO, Horvath EM, Dix PJ and Medgyesy P (1999) Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. Genetics 152: 1111-1122

Kay E, Vogel TM, Bertolla F, Nalin R and Simonet P (2002) In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. Appl Environ Microbiol 68: 3345-3351

Kay SA, Millar AJ, Smith KW, Anderson AH, Brandes C and Hall JC (1994) Video imaging of regulated firefly luciferase activity in transgenic plants and *Drosophila*. Promega Notes Magazine 19, page 22

Khan MS and Maliga P (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. Nat Biotechnol 17: 910-915

Kilby NJ, Davies GJ and Snaith MR (1995) FLP recombinase in transgenic plants: constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in *Arabidopsis*. Plant J 8: 637-652

Kindle KL, Richards KL and Stern DB (1991) Engineering the chloroplast genome - Techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci USA 88: 1721-1725

Klaus SMJ, Huang F-C, Eibl C, Koop H-U and Golds TJ (2002 eingereicht) Plastid transformation using phenotype-assisted selection: reconstitution of tobacco plastid mutants for rapid and proven production of transplastomic plants. Plant J, akzeptiert zur Publikation, Dezember 2002

Klein TM, Wolf ED, Wo R and Sanford JC (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327: 70-73

Klein U, De Camp JD and Bogorad L (1992) Two types of chloroplast gene promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci USA 89: 3453-3457

Köhler RH, Zipfel WR, Webb WW and Hanson MR (1997a) The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria in vivo. Plant J 11: 613-621

Köhler RH, Cao J, Zipfel WR, Webb WW and Hanson MR (1997b) Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. Science 276: 2039-2042

Kofer W, Koop H-U, Wanner G and 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: 166-173

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

Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N and Kumashiro T (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. Plant J 10: 165-174

Koop H-U, Steinmüller K, Wagner H, Rößler C, Eibl C and Sacher L (1996) Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. Planta 199: 193-201

Krause K, Maier RM, Kofer W, Krupinska K and Herrmann RG (2000) Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. Mol Gen Genet 263: 1022-1030

Larkin PJ and Scowcraft WR (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor Appl Genet 60: 197-214

Lawton R, Winfield S, Daniell H, Bhagsari AS and Dhir SK (2000) Expression of green-fluorescent protein gene in sweet potato tissues. Plant Mol Bio Rep 18: 139a-139i

Lloyd AM and Davis RW (1994) Functional expression of the yeast FLP/*FRT* site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. Mol Gen Genet 242: 653-657

Lössl A, Eibl C, Harloff H, Jung C and Koop H-U (2002 eingereicht) Polyester in transplastomic tobacco: Significant expression of polyhydroxybutyrate associated with growth reduction. Zur Veröffentlichung in Plant Cell Reports angenommen

Lutz KA, Knapp JE and Maliga P (2001) Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance. Plant Physiol 125: 1585-1590

Lynch M and Blanchard JL (1998) Deleterious mutation accumulation in organelle genomes. Genetica 102-103: 29-39

Lyznik LA, Mitchell JC, Hirayama L and Hodges TK (1993) Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. Nucl Acids Res 21: 969-975

Lyznik LA, Rao KV and Hodges TK (1996) FLP-mediated recombination of *FRT* sites in the maize genome. Nucleic Acids Res 24: 3784-3789

MacArthur M (2000) Triple-resistant canola weeds found in Alta. http://www.producer.com/articles/20000210/news/20000210news01.html

Maeser S and Kahmann R (1991) The Gin recombinase of phage Mu can catalyse site-specific recombination in plant protoplasts. Mol Gen Genet 230: 170-176

Maliga P (1993) Towards plastid transformation in flowering plants. Trends Biotechnol. 11: 101-107

Maliga P, Staub J, Carrer H, Kanevski I and Svab S (1994) Homologous recombination and integration of foreign DNA in plastids of higher plants. In: Homologous recombination and gene silencing in plants (Paszkowski J ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pages 83-93

Maliga P (2001) Plastid engineering bears fruit. Nat Biotechnol 19: 826-827

Maliga P (2002) Engineering the plastid genome of higher plants. Curr Opin Plant Biol 5: 164-172

Mankin SL and Thompson WF (2001) New green fluorescent protein genes for plant transformation: intron-containing, ER-localized, and soluble-modified. Plant Mol Bio Rep 19: 13-26

Martin P, Jullien E and Courvalin P (1988) Nucleotide sequence of *Acinetobacter baumannii aphA-6* gene: evolutionary and functional implications of sequence homologies with nucleotide-binding proteins, kinases and other aminoglycoside-modifying enzymes. Mol Microbiol 2: 615-625

Maryanski JH (1995) FDA's policy for foods development by biotechnology. US Food and Drug Administration (FDA), Center for Food Safety and Applied Nutrition, CFSAN Handout, Washington DC USA. In: Genetically Modified Foods: Safety Issues (eds: Engel, Takeoka, and Teranishi), American Chemical Society, Symposium Series No. 605, pages 12-22

Mayerhofer R, Langridge WHR, Cormier MJ and Szalay AA (1995) Expression of recombinant *Renilla* luciferase in transgenic plants results in high levels of light emission. Plant J 7: 1031-1038

Metz PLJ, Jacobsen E, Nap JP, Pereira A and Stiekema WJ (1997) The impact on biosafety of the phosphinothricin-tolerance transgene in inter-specific *B. rapa*×*B. napus* hybrids and their successive backcrosses. Theor Appl Genet 95: 442-450

McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, Hogan PS, Stalker DM and Maliga P (1995) Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. Biotech 13: 362-365

Meijer EG, Schilperoort RA, Rueb S, van Os-Ruygrok PE and Hensgens LA (1991) Transgenic rice cell lines and plants: expression of transferred chimeric genes. Plant Mol Biol 16: 807-820

Mereschkowski C (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreich. Biol Zentrum 25: 593-604

Mereschkowski C (1910) Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenesis, einer neuen Lehre der Entstehung der Organismen. Biol Zentrum 30: 278-303, 321-347, 353-367

Meurer J, Berger A and Westhoff P (1996) A nuclear mutant of *Arabidopsis* with impaired stability on distinct transcripts of the plastid *psbB*, *psbD*/*C*, *ndhH*, and *ndhC* operons. Plant Cell 8: 1193-1207

Mikkelsen TR, Andersen B and Jorgensen RB (1996) The risk of transgene spread. Nature 380: 31

Millar AJ, Short SR, Hiratsuka K, Chua N-H and Kay SA (1992a) Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants. Plant Mol Biol Rep 10: 324-337

Millar AJ, Short SR, Chua NH and Kay SA (1992b) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. Plant Cell 4: 1075-1087

Minko I, Holloway SP, Nikaido S, Carter M, Odom OW, Johnson CH and Herrin DL (1999) *Renilla* luciferase as a vital reporter for chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. Mol Gen Genet 262: 421-425

Monde R-A, Zito F, Olive J, Wollman F-A and Stern DB (2000a) Post-transcriptional defects in tobacco chloroplast mutants lacking the cytochrome b_6/f complex. Plant J 21: 61-72

Monde R-A, Greene JC and Stern DB (2000b) Disruption of the *petB-petD* intergenic region in tobacco chloroplasts affects *petD* RNA accumulation and translation. Mol Gen Genet 263: 610-618

Monde R-A, Greene JC and Stern DB (2000c) The sequence and secondary structure of the 3'-UTR affect 3'-end maturation, RNA accumulation, and translation in tobacco chloroplasts. Plant Mol Biol 44: 529-542

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497

Nakashita H, Arai Y, Shikanai T, Doi Y and Yamaguchi I (2001) Introduction of bacterial metabolism into higher plants by polycistronic transgene expression. Biosci Biotechnol Biochem 65: 1688-1691

Nakazono M and Hirai A (1993) Identification of the entire set of transferred chloroplast DNA sequences in the mitochondrial genome of rice. Mol Gen Genet 236: 341-346

Negrotto D, Jolley M, Beer S, Wenck AR and Hansen G (2000) The use of phosphomannose isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. Plant Cell Report 19: 287-2986

Nielsen KM, Gebhard F, Smalla K, Bones AM and van Elsas JD (1997) Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* BD413. Theor Appl Genet 95: 815-821

Norrander J, Kempe T and Messing J (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. Gene 26: 101-106

Odell J, Caimi P, Sauer B and Russel S (1990) Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. Mol Gen Genet 223: 369-378

O'Neill C, Horvath GV, Horvath E, Dix PJ and Medgyesy P (1993) Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. Plant J 3: 729-738

Onouchi H, Yokoi K, Matzuzaki H, Oshima Y, Matsuoka, Nakamura K and Machida Y (1991) Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. Nucl Acids Res 19: 6373-6478

Onouchi H, Nishihama R, Kudo M, Machida Y and Machida C (1995) Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genet 247: 653-660

Ow DW, Wood KV, DeLuca M, de Wet JR, Helinski DR and Howell SH (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Science 234: 856-859

Ow DW and Medberry SL (1995) Genome manipulation through site-specific recombination. Crit Rev Plant Sci 14: 239-261

Ow DW, Calendar R and Thomason L (2001) DNA recombination in eukaryotic cells by the bacteriophage phiC31 recombination system. International patent filing, WO 01/07572

Ow DW (2002) Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. Plant Mol Biol 48: 183-200

Pang Q, Hays JB and Rajagopal I (1992) A plant cDNA that partially complements *Escherichia coli recA* mutations predicts a polypeptide not strongly homologous to RecA proteins. Proc Natl Acad Sci USA 89: 8073-8077

Pang S-Z, DeBoer DL, Wan Y-C, Ye G-N, Layton JG, Neher MK, Armstrong CL, Fry JE, Hinchee MAW and Fromm ME (1996) An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. Plant Physiol 112: 893-900

Ponappa T, Brzozowski AE and Finer JJ (1999) Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein. Plant Cell Reports 19: 6-12

Potrykus I (1990) Gene transfer methods for plants and cell cultures. Ciba Found Symp 154: 198-208

Prentki P and Krisch HM (1984) *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene 29: 303-13

Puchta H (2000) Removing selectable marker genes: taking the shortcut. Trends Plant Sci 5: 273-274

Quaedvlieg NE, Schlaman HR, Admiraal PC, Wijting SE, Stougaard J and Spaink HP (1998) Fusions between green fluorescent protein and beta-glucuronidase as sensitive and vital bifunctional reporters in plants. Plant Mol Biol 38: 861-873

Reed ML, Wilson SK, Sutton CA and Hanson MR (2001) High-level expression of a synthetic red-shifted GFP coding region incorporated into transgenic chloroplasts. Plant J 27: 257-265

Ruf S, Kössel H and Bock R (1997) Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. J Cell Biol 139: 95-102

Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H and Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. Nat Biotechnol 19: 870-875

Russell SH, Hoopes JL and Odell JT (1992) Directed excision of a transgene from the plant genome. Mol Gen Genet 234: 49-59

Sager R (1962) Streptomycin as a mutagene of nonchromosomal genes. Proc Natl Acad Sci USA 48: 2018-2026

Salyers AA and Shoemaker NB (1994) Broad host range gene transfer: plasmids and conjugative transposons. FEMS Microbiol Ecol 15: 12-22

Salyers AA (1996) The real threat from antibiotics. Nature 384: 304

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular Cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2nd edition, Vol. 1-3)

Sanford JC, Klein TM, Wolf ED and Allen N (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. Particulate Sci Technol 5: 27-37

Sawahel WA (2001) Stable genetic transformation of cotton plants using polybrene-spermine treatment. Plant Mol Bio Rep 19: 377a-377f

Sheffler JA, Parkinson A and Dale PJ (1993) Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). Trans Res 2: 356-364

Sheffler JA and Dale PJ (1994) Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed (*Brassica napus*) to related species. Trans Res 3: 263-278

Sheffler JA, Parkinson A and Dale PJ (1995) Evaluating the effectiveness of isolation distances for field plots of oilseed rape (*Brassica napus*) using a herbicide-resistance transgene as selectable marker. Plant Breed 14: 317-321

Schimper AFW (1883) Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörner. Bot Zeit 41: 105-114

Schlüter K, Fütterer J and Potrykus I (1995) „Horizontal" gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs - if at all - at an extremely low frequency. Biotechnology 13: 1094-1098

Schneider M, Ow DW and Howell SH (1987) The in vivo pattern of firefly luciferase expression in transgenic plants. Plant Mol Biol 14: 935-947

Scott SE and Wilkinson MJ (1999) Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. Nat Biotechnol 17: 390-392

Serino G and Maliga P (1997) A negative selection scheme based on the expression of cytosine deaminase in plastids. Plant J 12: 697-701

Serino G and Maliga P (1998) RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. Plant Physiol 117: 1165-1170

Shaw KJ, Rather PN, Hare RS and Miller GH (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev 57: 138-163

Shen WH, Escudero J, Schlappi M, Ramos C, Hohn B and Koukolikova-Nicola Z (1993) T-DNA transfer to maize cells: histochemical investigation of beta-glucuronidase activity in maize tissues. Proc Natl Acad Sci USA 90: 1488-1492

Shikanai T, Endo T, Hashimoto T, Yamada Y, Asada K and Yokota A (1998) Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. Proc Natl Acad Sci USA 95: 9705-9709

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 BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H and Sugiura M (1986a) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome. Plant Mol Biol Rep 4: 111-147

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 BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H and Sugiura M (1986b) The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. EMBO J 5: 2043-2049

Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PT, Staub JM and Nehra NS (1999) Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. Plant J 19: 209-216

Sikdar SR, Serino G, Chaudhuri S and Maliga P (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana.* Plant Cell Reports 18: 20-24

Smalla K, Borin S, Heuer H, Gebhard F, van Elsas JD and Nielseln K (2000) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria - are there new data to fuel the debate. Proceedings of the 6th International Symposium on THE BIOSAFETY OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS, University Extension Press, Saskatchewan, pages 146-154

Smyth S, Khachatourians GG and Phillips PWB (2002) Liabilities and economics of transgenic crops. Nat Biotechnol 20: 537-541

Sonti RV, Tissier AF, Wong D, Viret JF and Signer ER (1995) Activity of the yeast FLP recombinase in *Arabidopsis*. Plant Mol Biol 28: 1127-1132

Squire GR, Crawford JW, Ramsay G Thompson C and Bown J (1999) Gene flow at the landscape level. In: Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops (Lutman PW ed.). British Crop Protection Council, London, pages 57-64

Srivastava V, Anderson OD and Ow DW (1999) Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. Proc Natl Acad Sci USA 96: 11117-11121

Staniland BT, McVetty PBE, Friesen LF, Yarrow S, Freyssinet G and Freyssinet M (2000) Effectiveness of border areas in confining the spread of transgenic *Brassica napus* pollen. Canadian J Plant Sci 80: 521-526

Staub JM and Maliga P (1993) Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA. EMBO J 12: 601-606

Staub JM and Maliga P (1994a) Extrachromosomal elements in tobacco plastids. Proc Natl Acad Sci USA 91: 7468-7472

Staub JM and Maliga P (1994b) Translation of *psbA* mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids. Plant J 6: 547-553

Staub JM and Maliga P (1995a) Expression of a chimeric *uidA* gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids. Plant J 7: 845-848

Staub JM and Maliga P (1995b) Marker rescue from the *Nicotiana tabacum* plastid genome using a plastid/*Escherichia coli* shuttle vector. Mol Gen Genet 249: 37-42

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

Stewart GJ and Sinigalliano CD (1990) Detection of horizontal gene transfer by natural transformation in native and introduced species of bacteria in marine and synthetic sediments. Appl Environ Microbiol 56: 1818-1824

Stryer L (1995) Gene arrangements. In: Biochemistry, Freeman-Verlag New York (4th edition), pages 817-840

Sueoka N (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci USA 46: 83-91

Sugita M, Svab Z, Maliga P and Sugiura M (1997) Targeted deletion of *sprA* from the tobacco plastid genome indicates that the encoded small RNA is not essential for pre-16S rRNA maturation in plastids. Mol Gen Genet 257: 23-27

Sugita K, Matsunagaa and E Ebinuma H (1999) Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing. Plant Cell Reports 18: 941-947

Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E and Ebinuma H (2000) A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. Plant J 22: 461-469

Suzuki DT, Griffin AJF, Miller JH and Lewontin RC (1991) Rekombination bei Bakterien und Viren. In: Genetik, VCH-Verlag Weinheim, Seiten 179-212

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

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

Syvanen M (1999) In search of horizontal gene transfer. Nat Biotechnol 17: 833

Tepfer D (1984) Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell 37: 959-967

Thomas MR and Rose RJ (1983) Plastid number and plastid structural changes associated with tobacco mesophyll protoplast culture and plant regeneration. Planta 158: 329-338

Timmons AM, O'Brien ET, Charter YM, Dubbels SJ and Wilkinson MJ (1995) Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. Euphytica 85: 417-423

Tschäpe H (1994) The spread of plasmids as a function of bacterial adaptability. FEMS Microbiol Ecol 15: 23-32

Vain P, Worland B, Kohli A Snape JW and Christou P (1998) The green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation. Proc Natl Acad Sci USA 90: 913-917

Widmer F, Seidler RJ and Watrud LS (1996) Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. Mol Ecol 5: 603-613

Widmer F, Seidler RJ, Donegan KK and Reed GL (1997) Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field. Mol Ecol 6: 1-7

Witte W (1998) Medical consequence of antibiotic use in agriculture. Science 279: 996-997

Wright GD and Thompson PR (1999) Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. Front Biosci 4: D9-21. Review

Xiong L, David L, Stevenson B and Zhu J-K (1999) High throughput screening of signal transduction mutants with luciferase imaging. Plant Mol Bio Rep 17: 159-170

Ye GN, Hajdukiewicz PT, Broyles D, Rodriguez D, Xu CW, Nehra N and Staub JM (2001) Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. Plant J 25: 261-270

Yim T (2000) http://dragon.zoo.utoronto.ca/~jlm-gmf/T0401B/hgt.html#top

Yoder JI and Goldsbrough AP (1994) Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. Biotechnology 12: 263-267

Zhang HM, Yang H, Rech EL, Golds TJ, Davis S, Mulligan BJ, Cocking EC and Davey MR (1988) Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. Plant Cell Reports 7: 379-384

Zubko E, Scutt C and Meyer P (2000) Intrachromosomal recombination between *attP* regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. Nat Biotechnol 18: 442-445

Zuo J, Niu QW, Moller SG and Chua NH (2001) Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. Nat Biotechnol 19: 157-161

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Schematische Übersicht zur Herstellung markerfreier transplastomer Tabakpflanzen ... 17
Abb. 2.1 Klonierung der Transformationsvektoren für die Deletion und Rekonstitution des *petA*-Gens ... 24, 25
Abb. 2.2 Dichtegradienten-Zentrifugation ... 28
Abb. 3.1 Verwendung von Mikrokolonien als Zielgewebe für die Plastidentransformation ... 39
Abb. 3.2 Verwendung des *aphA-6*-Gens als plastidärer Marker ... 43
Abb. 3.3 Deletion des plastidären *petA*-Gens ... 48
Abb. 3.4 Samenproduktion von Δ*petA*-Mutanten ... 51
Abb. 3.5 Rekonstitution des plastidären *petA*-Gens ... 54
Abb. 3.6 Integration des gesamten Transformationsvektors ins plastidäre Genom ... 59
Abb. 3.7 Schematische Darstellung der *petA*-Rekonstitution zur Herstellung markerfreier Plastidentransformanten ... 63
Abb. 3.8 Herstellung markerfreier Plastidentransformanten durch *petA*-Rekonstitution ... 65

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Primer ... 22
Tab. 2.2 Pflanzen-Kulturmedien ... 27
Tab. 3.1 Chloroplasten-Transformation: neutrale *aadA*-Insertion ... 39
Tab. 3.2 Chloroplasten-Transformation: neutrale *aphA-6*-Insertion ... 44
Tab. 3.3 Chloroplasten-Transformation: *petA*-Deletion ... 47
Tab. 3.4 Chloroplasten-Transformation: *petA*-Rekonstitution ... 53
Tab. 3.5 ‚Plasmid-rescue' aus Plastidentransformante 65-38 ... 58
Tab. 3.6 Chloroplasten-Transformation: Mixotrophe Selektionsbedingungen ... 62
Tab. 3.7 Chloroplasten-Transformation: Markerfreie Plastidentransformanten ... 66

Lebenslauf

PERSONALIEN

Name	Sebastian Martin Johannes Klaus
Geburtstag	27.04.1973
Geburtsort	München
Wohnort	Gräfstr. 34, 81241 München
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULBILDUNG

1980 - 1993	Rudolf-Steiner-Schule München-Schwabing
Mai 1993	Abitur

ZIVILDIENST

Okt. 1993 - Okt. 1994	Haus Hohenfried e.V., Bayrisch Gmain

STUDIUM

Nov. 1994 - Okt. 1999	Studium der Biologie an der LMU München
Okt. 1996	Vordiplom
Jan. 1999 - Okt. 1999	Diplomarbeit am Botanischen Institut der LMU München bei Dr. Waltraud Kofer (Thema: „Chondriomtransformation bei *Nicotiana tabacum*: Vektor, Selektion und Transformation“)
Okt. 1999	Diplom
Jan. 2000 - Apr. 2000	Arbeitsaufenthalt an der University of Oregon, Eugene, USA
Mai 2000 - Dez. 2002	Promotion bei der ICON Genetics AG, Research Centre Freising, betreut von Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop (Thema: „Markerfreie transplastome Tabakpflanzen“)

Veröffentlichungen

Huang F-C, Klaus SM, Herz S, Zou Z, Koop H-U and Golds TJ (2002) Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection. Mol Genet Genomics 268: 19-27

Klaus SM, Huang F-C, Eibl C, Koop H-U and Golds TJ (2002) Rapid and proven production of transplastomic tobacco plants by restoration of pigmentation and photosynthesis. Eingereicht zur Publikation im Plant J

Huang F-C, Klaus SM, Golds TJ and Koop H-U (2003) Generation of marker-free plastid transformants using a transiently integrated selection marker. In Vorbereitung zur Publikation in Nature Biotechnology

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand bei der Firma ICON Genetics AG, Research Centre Freising, unter Leitung von Prof. Dr. H.-U. Koop.

Ulrich Koop danke ich ganz besonders für die Ermöglichung der Doktorarbeit bei ICON Genetics in Freising und für die sehr gute Zusammenarbeit während der gesamten Zeit.

Rainer Maier danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Mein ganz herzlicher Dank gilt allen früheren und jetzigen Mitarbeitern der Firma ICON Genetics in Freising, die alle zu einer außerordentlich positiven Gesamtstimmung beigetragen haben: Tina, Caro, Simin, Sandra, Angela, Christian, Stefan H., Conny, Monika, Fong-Chin, Stefan M., Tim, Michael, Rebecca, Jenny, Steffi, Matthias und nicht zu vergessen Nora.

Für das gründliche Lesen des Manuskripts sei Monika und Stefan M. gedankt.

Besondere Erwähnung gilt Stefan M., der mir vor allem in der Anfangsphase eine große Hilfe war und der zudem immer Zeit für alle meine Fragen hatte.

Tim möchte ich neben seiner Unterstützung bei allen wissenschaftlichen Angelegenheiten und dem Schreiben der Veröffentlichungen auch ganz besonders für das gute freundschaftliche Verhältnis danken.

Dankend sei auch Jörg Meurer erwähnt für die Hilfe bei den HCF-Aufnahmen.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern, die mir stets mit großer Unterstützung beigestanden sind.

Dankend sollen hier zudem Christopher, Irmi, Franz und Birgit sowie Björn erwähnt werden, mit denen die zusammen verbrachte Zeit neben dem Arbeitsalltag eine große Bereicherung und ein guter Ausgleich war.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

München, den 06.12. 2002