

**Aktivierende T-DNA-Mutagenese  
in *Nicotiana tabacum*-Mesophyll-Protoplasten**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Marion Stoll  
aus Mayen

Köln, 2002

Berichterstatter:

Prof. Dr. Jozef Schell

Prof. Dr. Hansjörg Schneider-Poetsch

Tag der mündlichen Prüfung:

06.05.2002

## ABKÜRZUNGEN

(RT)-PCR	(Reverse Transkription)-Polymerasekettenreaktion
Amp	Ampicillin-Resistenz-Gen
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	komplementäre DNA
cpm	„counts per minute“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Ribonukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HPT	Hygromycinphosphotransferase-Gen
kb	Kilobasen(paare)
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NAA	1-Naphtylelessigsäure
NPTII	Neomycinphosphotransferase-Gen
OD	optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
tp-Sul	Sulfadiazin-Resistenz-Gen
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan

---

<b>INHALT</b>	<b>Seite</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	
1.1. Erzeugung genmarkierter Pflanzen durch Insertionsmutagenese	1
1.2. Transkriptionale Verstärkung von Genen	3
1.3. Grundlagen der Arbeit	
1.3.1. Re-Evaluierung mutanter Pflanzenlinien aus „activation T-DNA tagging“-Experimenten	4
1.3.2. Bisherige „activation tagging“-Experimente	
1.3.2.1. T-DNA-Mutagenese	6
1.3.2.2. Mutagenese durch Integration von Transposons	8
1.4. Ziel der Arbeit	9
<b>2. MATERIAL &amp; METHODEN</b>	
<b>2.1. Material</b>	
2.1.1. Pflanzen	11
2.1.2. Bakterienstämme	11
2.1.3. Oligonukleotide	11
2.1.4. Vektorplasmide	12
2.1.5. Molekularmassenstandards	13
2.1.6. Enzyme und Proteine	
2.1.6.1. Restriktionsenzyme	13
2.1.6.2. Modifizierende Enzyme	13
2.1.7. Reagenziensysteme	13
2.1.8. Chemikalien	
2.1.8.1. Feinchemikalien	14
2.1.8.2. Sonstige Materialien	14
2.1.9. Medien	
2.1.9.1. Medien für Pflanzen- und Zellkultur	15
2.1.9.2. Medien für Bakterienkulturen	15

## **2.2. Methoden**

2.2.1. Pflanzen- und Gewebekultur	
2.2.1.1. Sterilisation der Samen	16
2.2.1.2. Pflanzenkultur	16
2.2.1.3. Isolierung von <i>N. tabacum</i> -Mesophyll-Protoplasten	16
2.2.1.4. Protoplastenkultivierung und Regeneration	17
2.2.1.5. [ <sup>3</sup> H] Thymidin-Inkorporationsassay	18
2.2.1.6. PEG-Transformation von <i>N. tabacum</i> -Mesophyll-Protoplasten mit anschließender Regeneration transgener Pflanzen	18
2.2.1.7. Transformation von <i>N. tabacum</i> -Mesophyll-Protoplasten mit <i>A. tumefaciens</i>	19
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	
2.2.2.1. Standardtechniken	20
2.2.2.2. DNA-Isolierung aus Pflanzengewebe	20
2.2.2.3. Plasmid-Isolierung aus Bakterien	21
2.2.2.4. RNA-Isolierung aus Pflanzengewebe	21
2.2.2.5. Automatische DNA-Sequenzierung	22
2.2.2.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.2.2.7. RNA (RT)-PCR	23
2.2.2.8. DNA-DNA-Hybridisierung „Southern Blotting“	24

## **3. ERGEBNISSE**

3.1. Effekt verschiedener Auxin- und Cytokinin-Konzentrationen auf die Zellteilung von Tabak-Mesophyll-Protoplasten	26
3.2. Effekt verschiedener Saccharose-Konzentrationen auf die Zellteilung von Tabak-Mesophyll-Protoplasten	26
3.3. Regenerationsfähigkeit von Protoplasten in Abhängigkeit der Phytohormon-Konzentration	28
3.4. Regenerationsfähigkeit von Protoplasten in Abhängigkeit des Mediums	28

---

3.5. Ermittlung der Transformationseffizienz von SR1-Mesophyll-Protoplasten mittels <i>A. tumefaciens</i> Kokultivation	29
3.6. Konstruktion des Plasmids pUCHN <sup>-</sup>	33
3.7. PEG-Transformation des Vektors pUCHN <sup>-</sup> in SR1-Mesophyll-Protoplasten	33
3.8. Molekulare Analyse der pUCHN <sup>-</sup> -Pflanzen	33
3.9. Phänotypische Analyse der mit pUCHN <sup>-</sup> transformierten Pflanzen 2 und 6	37
3.10. <i>A. tumefaciens</i> Kokultivierung von pUCHN <sup>-</sup> -Mesophyll-Protoplasten	
3.10.1. Beschreibung des zur Mutagenese verwendeten binären Vektors pAC106	38
3.10.2. Regeneration von Kanamycin-resistenten Mutanten aus transformierten pUCHN <sup>-</sup> -2 und pUCHN <sup>-</sup> -6-Protoplasten	38
3.11. Analyse der T-DNA markierten Linien	40
3.11.1. „Southern Blot“-Analyse der positiven 2K <sub>r</sub> -DNA	43
3.11.2. Expressionsanalyse des NPTII-Gens in 2K <sub>r</sub>	45
3.12. Funktionsanalyse des isolierten <i>Bam</i> H I-Plasmids aus 2K <sub>r</sub> in <i>E. coli</i>	46
3.13. Klonierung eines neuen binären Vektors pTAG für Genmarkierungs- Experimente mit Tabak-Mesophyll-Protoplasten	47
<b>4. DISKUSSION</b>	
4.1. Optimierung des Regenerationssystems für Tabak-Mesophyll-Protoplasten	50
4.2. Herstellung transgener Tabak-Pflanzen mit einem nicht funktionalen Neomycinphosphtransferase-Gen	52
4.3. Genmarkierung mit einem aktivierenden T-DNA-Vektor und Selektion Kanamycin-resistenter Mutanten	
4.3.1. Transformationsraten bei Kokultivierung von Tabak-Mesophyll- Protoplasten mit <i>A. tumefaciens</i>	53
4.3.2. Regeneration von Kanamycin-resistenten Mutanten	54
4.4. Molekularbiologische Analyse der Kanamycin-resistenten Pflanzen 2K <sub>r</sub>	
4.4.1. Reisolation der T-DNA aus den markierten Linien 2.1.2 und 2.2.1	55
4.4.2. Molekularbiologische Charakterisierung der Pflanze 2K <sub>r</sub>	56

4.4.3. Funktionaler Nachweis des <i>Bam</i> H I-Plasmids aus dem „plasmid rescue“ der Pflanze 2K <sub>r</sub>	57
4.5. Beurteilung des angewendeten Genmarkierungs-Systems	
4.5.1. Statistische Auswertung	58
4.5.2. Vergleich mit anderen „T-DNA activation tagging“-Systems	59
4.6. Ausblick	61
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	63
<b>6. LITERATUR</b>	64

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Erzeugung genmarkierter Pflanzen durch Insertionsmutagenese

Insertionsmutagenese ist zu einer unerläßlichen Methode bei der Herstellung von Mutanten geworden. Die Integration bekannter DNA-Sequenzen in das Pflanzengenom erleichtert molekularbiologische Analysen erheblich, da das Gen bzw. die DNA-Region, die von der Insertion beeinflußt werden, markiert („tagged“) sind. Diese markierten Bereiche können mit Hilfe der eingesetzten Markersequenz durch molekularbiologische Standardmethoden isoliert werden. Grundlage von Genmarkierungs-Experimenten ist ein effektives System zur zufälligen Eingliederung von Markersequenzen an beliebiger Stelle des Genoms und eine zuverlässige Methode zur Detektion von Mutanten. Zwei verschiedene experimentelle Ansätze des „taggings“ sind möglich.

Ein verbreitetes Mutagenese-System stellt die Verwendung von transponierbaren Elementen, sogenannten Transposons, dar. Hierbei werden Kreuzungen von Linien, die Transposons enthalten mit Transposon-freien Linien durchgeführt. Darauf folgt eine phänotypische Analyse von Mutanten der resultierenden Nachkommen (Wienand und Saedler, 1987; Balcells *et al.*, 1991). Gut charakterisierte transponierbare Elemente kommen in *Zea mays* und *Antirrhinum majus* im Pflanzengenom vor (Döring, 1989; Walbot, 1992). In vielen weiteren Pflanzen sind Transposons nicht nachgewiesen. Um auch in diesen Pflanzen Transposon-vermittelte Genmarkierungs-Experimente durchführen zu können werden heterologe transponierbare Elemente verwendet. Das *Activator* (*Ac*)-Element von Mais ist beispielsweise in Tabak (Baker *et al.*, 1986), Kartoffel (Knapp *et al.*, 1988), Tomate (Yoder *et al.*, 1988) und *Arabidopsis thaliana* (Grevelding *et al.*, 1992) aktiv. Nachteilig an dieser Methode ist die geringe Transpositionsfrequenz, das Vorkommen verschiedener Transposons sowie mehrere Kopien eines Transposons, und letztlich die Möglichkeit der erneuten Excision aus einem „getaggtten“ Gen.

Die zweite Möglichkeit der Insertionsmutagenese erfolgt durch die Übertragung von T-DNA-Sequenzen ins Pflanzengenom mittels *Agrobacterium tumefaciens* („T-DNA-tagging“). Dieses System führt zu stabilen Transformationsereignissen. Genmarkierung unter Verwendung von



T-DNA beruht auf dem natürlichen Vorgang der Infektion und Transformation verwundeter Pflanzen durch *A. tumefaciens* und ist somit mit sämtlichen durch *A. tumefaciens* transformierbaren Pflanzen möglich. Die Wahrscheinlichkeit mit der ein Gen markiert wird, ist durch die Transformationsrate bedingt.

Virulente *A. tumefaciens* Stämme besitzen ein T<sub>1</sub>-Megaplasmid auf dem die T-DNA, umgeben von rechten und linken Wiederholungssequenzen („border“) sowie Virulenz-Gene (*vir*) angeordnet sind. Der Vorgang der Transformation wird von phenolischen Substanzen (Acetosyringon) eingeleitet, die von verwundeten Pflanzenzellen ausgeschieden werden. Dabei wird einzelsträngige T-DNA in den Nukleus der Pflanzenzelle geschleust. Dies wird durch die *vir*-Genprodukte verursacht (Zambryski, 1992; Lessel und Lanka, 1994; Zupan und Zambryski, 1995; Zupan und Zambryski, 1997; Bundock und Hooykaas, 1998; Gelvin, 1998). Die Integration der T-DNA erfolgt nicht sequenzspezifisch durch illegitime Rekombination (Gheysen *et al.*, 1991, Gheysen *et al.*, 1998; Mayerhofer *et al.*, 1991), sondern an beliebiger Stelle des Pflanzengenoms, zumeist allerdings in transkribierte Bereiche (Chyi *et al.*, 1986; Koncz *et al.*, 1989). Infolge der Integration der T-DNA wird durch die Expression bakterieller Gene des Hormon-Metabolismus die intrazelluläre Hormonbalance inokulierter Pflanzenorgane verändert. Es kommt zu neoplastischem Wachstum. Außerdem enthält die T-DNA-Sequenzen deren Genprodukte Synthese und Transport von Opinen in die Interzellularen bewirken. Die dort angesiedelten Agrobakterien sind in der Lage, Opine als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu verwerten (Petit und Tempe, 1985). Damit macht sich das System der Genmarkierung mit Hilfe von *A. tumefaciens* den einzig bekannten natürlichen Vorgang der Pflanzentransformation zu Nutze.

Für den Transfer der T-DNA in *cis* werden lediglich die linke und rechte „border“-Sequenz benötigt. Sämtliche anderen Bestandteile der T-DNA können ausgetauscht und somit durch nicht onkogene DNA-Sequenzen ersetzt werden (Zambryski *et al.*, 1983). Die *vir*-Region kann auch in *trans* auf sogenannten „Helferplasmiden“ lokalisiert sein. Damit wird es möglich kleinere, leichter handhabbarere T-DNA-Vektoren zu konstruieren (Bevan, 1984). Damit konnte die Entwicklung verschiedener Vektoren nach den jeweiligen experimentellen Erfordernissen erfolgen.

So haben beispielsweise Feldmann und Marks (1987) einen unspezifischen Vektor entworfen, der ein funktionales Neomycinphosphotransferase-Gen (NPTII) enthält. Mit diesem Vektor wurden Arabidopsis-Samen transformiert, um eine Population von Kanamycin-resistenten Mutanten zu erzeugen (Feldmann, 1991). Diese Transformanten können durch phänotypische Analyse oder ausgesuchte Selektionsmethoden nach Mutationen durchsucht werden.

Das primäre Werkzeug zur Auffindung von Genen ist nach dem oben geschilderten Ansatz also die Suche nach Mutationen, die durch den Verlust der Funktion des jeweiligen Genproduktes („loss-of-function“) entstehen. Dabei handelt es sich meist um rezessive Mutationen, deren Auswirkung sich erst in homozygoten Nachkommen zeigt. Ein Nachteil dieser Methode ist die seltene Identifizierung von redundanten Genen, da es oft eine Mehrzahl von Genen gibt, die sowohl in ihrer kodierenden wie auch in ihrer funktionalen Region sehr ähnlich sind. Desweiteren ist es nicht möglich durch „loss-of-function“-Mutationen Gene zu finden die in mehreren Stadien des Zellzyklusses benötigt werden und so in embryonaler oder gametophytischer Lethalität resultieren (Weigel *et al.*, 2000).

Gene, die nicht zwingend für bestimmte Prozesse benötigt werden, können durch mutante Allele identifiziert werden, falls diese die fehlende Funktion in den entsprechenden Vorgängen ausreichend ersetzen. Ähnlich steht es mit essentiellen Genen, falls mutante Allele eine ektopische Aktivierung von Prozessen regulieren, die zum Überleben des Organismus führen. In beiden Fällen können nur Mutationen erfolgversprechend sein, die zu einer zusätzlichen Aktivierung von Genen führen („gain-of-function“). Dabei handelt es sich also um dominante Mutationen. Zudem sind solche Mutationen in primär transformierten Linien erkennbar.

## **1.2. Transkriptionale Verstärkung von Genen**

Die Induktion dominanter Mutationen mittels T-DNA-Markierung kann durch artifizielle Erhöhung der Expression eines Gens erreicht werden. Ein Beispiel eines transkriptional verstärkten Gens im Vergleich zu einer rezessiven Mutation ohne phänotypische Veränderung beschreiben Hua und Meyerowitz (1998). Während einzelne dominante Mutationen von unterschiedlichen Histidinkinase-Genen zur konstitutiven Reprimierung von Ethylen und somit zu einer Veränderung des Phänotyps führen, bewirkt das Ausschalten individueller Gene keine

phänotypische Ausprägung. Ein Beispiel für die Möglichkeit mit Hilfe dominanter Mutationen Gene zu identifizieren, deren Deaktivierung zu embryonaler Lethalität führen würden bietet die Isolierung des homeotischen Gens *Antennapedia* (*Antp*) in *Drosophila* (Denell *et al.*, 1981). Die normale Funktion dieses Gens besteht in der Entwicklung von Thorax-Segmenten. *Antp* wurde mittels „gain-of-function“-Mutation gefunden, die eine ektopische Expression des Gens bewirkte (Gehring, 1967). Solche Transformanten entstehen entweder durch Mutationen in der kodierenden Region oder durch Mutationen, die ganze Genexpressionsmuster verändern, wie in dominanten *Antp* Mutanten (Schneuwly *et al.*, 1987). Erstere führen zur konstitutiven Aktivierung der resultierenden Proteine, wie bei dominanten Mutanten des Ethylen-Signaltransduktionswegs (Chang *et al.*, 1993). Traditionell werden solche Mutationen durch chromosomale Reorganisationen oder Transposons induziert, die Gene unter die Kontrolle von neuen Promotoren oder Verstärkerelementen bringen (Chadwick *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1993; Kluppel *et al.*, 1997; Brunner *et al.*, 1999). Um dominante Mutationen in *Arabidopsis* zu erzeugen, werden Konstrukte benutzt, die aus einem transponierbaren *Dissociation* (*Ds*)-Element bestehen, an dessen Ende ein CaMV 35S-Promotor integriert ist (Wilson *et al.*, 1996; Schaffer *et al.*, 1998; Fridborg *et al.*, 1999). Der CaMV 35S-Promotor vermittelt in den meisten Organen verschiedener, transgener Pflanzen starke, konstitutive Expression (Odell *et al.*, 1985; Jefferson *et al.*, 1987; Kay *et al.*, 1987; Sanders *et al.*, 1987, Ow *et al.*, 1987, Benfey *et al.*, 1989, Benfey *et al.*, 1990, Tyagi, A. K., 2001, Kozak, M., 2001). Somit ist er geeignet um einen T-DNA-Vektor zu konstruieren, mit dem es möglich ist, durch dominante Mutationen Pflanzengene dereguliert zu exprimieren. Weigel *et al.* (2000) beschrieben eine ähnliche Methode, in der ein Quartett von Verstärkerelementen des 35S-Promotors zur Induktion solcher Mutationen in die T-DNA integriert wird.

### **1.3. Grundlagen der Arbeit**

#### **1.3.1. Re-Evaluierung mutanter Pflanzenlinien aus „activation T-DNA tagging“-Experimenten**

In unterschiedlichen früheren Experimenten wurde „activation T-DNA tagging“ verwendet um drei verschiedene mutante Zelllinien zu erzeugen, aus welchen durch Selektion in Abwesenheit von Phytohormonen Pflanzen regeneriert werden konnten (Harling *et al.*, 1997, Hayashi *et al.*,

1992, Miklashevichs *et al.*, 1997, Walden *et al.*, 1994). Dabei wurde beschrieben, daß aus den genmarkierten mutanten *Nicotiana tabacum*-Pflanzen *cyi1* (Miklashevichs *et al.*, 1997), *axi4/1* (Harling *et al.*, 1997) sowie *axi159* (Hayashi *et al.*, 1992) jeweils Protoplasten isoliert werden können, die sich in Abwesenheit von Auxin im Kulturmedium teilen. Angeblich teilen sich Zellen der *cyi1* Pflanze sogar ohne Auxin und Cytokinin (Miklashevichs *et al.*, 1997).

Weiterhin wurde behauptet, daß die T-DNA Integration und die daraus resultierende Deregulation der flankierenden Pflanzengene für ein sogenanntes Phytohormon-unabhängiges Wachstum verantwortlich sind. Um dies zu zeigen, wurde die aus den Pflanzen isolierte T-DNA inklusive benachbarter pflanzlicher DNA-Sequenzen mittels PEG in Tabak-Wildtyp-Protoplasten transferiert. Diese Zellen sollten sich dann wiederum Phytohormon-unabhängig teilen.

In Schell *et al.* (1999) erwiesen sich jedoch die beschriebenen Daten bezüglich der Phytohormon-Unabhängigkeit der mutanten Zellkulturen als nicht reproduzierbar. Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß die aus den Pflanzen isolierten DNA-Sequenzen nicht in der Lage sind, auf transformierte Tabak-Mesophyll-Protoplasten Phytohormon-unabhängiges Wachstum zu übertragen. Damit wurde das gesamte System des „activation taggings“ durch *A. tumefaciens* vermittelte Transformation unter Verwendung von Tabak-Mesophyll-Protoplasten grundsätzlich in Frage gestellt, obwohl der Einsatz einer solchen Gewebekultur mit Tabak-Mesophyll-Protoplasten mehrere große Vorteile hat. Die Isolierung und die Kultivierung einer hohen Anzahl von Tabak-Protoplasten ist einfach, schnell durchführbar und nimmt nur wenig Platz in Anspruch. Zudem ist zur Betreuung solcher Kulturen nur eine Person nötig. Die *A. tumefaciens* vermittelte Transformation ist mit durchschnittlichen Transformationsraten von bis zu 45% (de Buck *et al.*, 1998) sehr effektiv. Außerdem würde ein solches funktionierendes „activation tagging“-Verfahren schnell zu Ergebnissen führen, da durch direkte Selektion von mutierten Einzelzellen nach dem gewünschten Phänotyp „gescreent“ werden kann. Die so erzeugten Mutationen sind zudem meist dominant, mindestens aber semidominant.

## 1.3.2. Bisherige „activation tagging“-Experimente

### 1.3.2.1. T-DNA-Mutagenese

Neben den in Kapitel 1.3.1. erwähnten Experimenten wurden später weitere verschiedene „activation T-DNA tagging“-Experimente durchgeführt. Weigel *et al.* (2000) benutzten T-DNA-Vektoren mit vier Verstärkerelementen des CaMV 35S-Promotors und erzeugten damit unter großem personellen Aufwand mehrere zehntausend transgene *Arabidopsis*-Pflanzen. Die Transformation erfolgte durch Besprühen blühender Pflanzen mit *A. tumefaciens* mit Hilfe der Vakuum-Infiltrationsmethode. Nur 2% der entstandenen Samen waren mutagenisiert. Aus der resultierenden transgenen Population wurden 30 Pflanzen mit unterschiedlich ausgeprägten Phänotypen isoliert. Diese sind durch dominante Mutationen entstanden. Die Verstärkerelemente sind meist in unmittelbarer Nähe, zwischen 380 bp bis 3,6 kb, der deregulierten Gene inseriert. Während in vielen „loss-of-function“-Mutanten die Anordnung der T-DNA ins Genom Schwierigkeiten bei der Wiederfindung und Reisolation bereitet (Feldmann, 1991), stellt sich dieses Problem in den dominant markierten Mutanten nicht. Die erforderlichen Interaktionen zwischen Verstärkerelementen und den flankierenden Pflanzen-DNA-Sequenzen zur Ausprägung der dominanten Mutationen werden für diesen positiven Effekt verantwortlich gemacht. Die Isolierung der T-DNA inklusive der flankierenden Pflanzen-DNA-Sequenzen erfolgt durch Restriktion der genomischen DNA mittels bestimmter ausgewählter Enzyme: Aus dem Verdau ergeben sich DNA Fragmente, die Bereiche der T-DNA mit einem in *Escherichia coli* funktionalen Replikationsursprung und angrenzende Pflanzen-DNA-Sequenzen enthalten. Sie werden durch Ligation mit anschließender Transformation in *E. coli* identifiziert. Diese Methode der Reisolation wird „plasmid rescue“ genannt. Durch Retransformation der aus den Mutanten isolierten deregulierten Gene in Wildtyp-*A. thaliana*-Pflanzen wird der jeweilige erwartete Phänotyp erneut erzeugt. Ein entscheidendes Kontrollexperiment besteht dabei in der Verwendung genomischer Fragmente der originalen Mutanten. Außerdem können die überexprimierten Gene in Vektoren kloniert werden, die das Quartett der 35S-Verstärkerelemente beinhalten. Die dritte Strategie besteht darin, die cDNA des entsprechenden Gens unter der Kontrolle des gesamten 35S-Promotors zu stellen. Mit dieser Technologie konnten mehrere verschiedene Gene isoliert und charakterisiert werden.

Kardailsky *et al.* (1999) isolierte *FLOWERING LOCUS T (FT)* mit Hilfe der von Weigel *et al.* (2000) beschriebenen „activation T-DNA tagging“-Methode in *Arabidopsis*. Das FT-Genprodukt führt zu einem verfrühten Blühvorgang der Pflanze. Neff *et al.* (1999) identifizierten ebenfalls unter Verwendung des von Weigel *et al.* (2000) eingeführten Genmarkierungs-Systems *BAS1*, ein Gen das den Brassinosteroid-Signaltransduktionsweg und die Lichtabhängigkeit in *Arabidopsis* reguliert. Die Überexpression von *BAS1*, ein Cytochrom P450, *CYP72B1*, inaktiviert die Wirkung von Brassinosteroiden. Ito und Meyerowitz (2000) induzierten durch Überexpression eines Cytochrom P450 Gens, *CYP78A9*, große verformte und samenlose Früchte in *Arabidopsis*. Diese stark ausgeprägten Effekte lassen die Annahme zu, daß *CYP78A9* eine Rolle in der Fruchtentwicklung spielt. Durch „activation T-DNA tagging“-Experimente identifizierten Borevitz *et al.* (2000) eine hell-purpurne Mutante *pap1-D (production of anthocyanin pigment 1-Dominant)*. Der mutierte Phänotyp wird durch einen konservierten MYB Regulator der Phenylpropanoid-Biosynthese in *Arabidopsis* hervorgerufen. In Experimenten die zur Suche nach Mutanten in der Blattentwicklung von *A. thaliana* von van der Graaff *et al.* (2000) durchgeführt wurden, konnte eine aktivierte T-DNA-markierte Mutante isoliert werden, die Blätter ohne Blattstiel ausbildet. Das deregulierte Gen *LEAFY PETIOLE (LEP)* kodiert für ein Protein mit einer Domäne, die Ähnlichkeiten mit der DNA-Bindungsdomäne der AP2/EREBP Familie von Transkriptionsfaktoren aufweist. Huang *et al.* (2001) klonierten durch „activation T-DNA tagging“ *STURDY*, ein Patatin-ähnliches Gen in *Arabidopsis*. Die mutante Pflanze zeigt einen starren Infloreszenzstiel, dickere Blätter, kürzere Samenkapseln, größeren Samen, rundlich geformte Blüten und verzögertes Wachstum. Lee *et al.* (2000) identifizierten *AGAMOUS-LIKE 20 (AGL20)*, ein Gen der MADS-Domäne, in mutanten *Arabidopsis*-Linien *FRI FLC*. Pflanzen der *FRI FLC*-Linie blühen sehr spät im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Die Überexpression von *AGL20* unterdrückt in diesen Mutanten den verspäteten Blühvorgang, sowie die verzögerten Abfolgen der vegetativen Phasen der Pflanzenentwicklung. Li *et al.* (2001) transformierten transgene *Arabidopsis*-Linien, die durch eine Mutation im Brassinosteroid-Signaltransduktionsweg gekennzeichnet sind (*brassinosteroid-insensitive, BRI1*), mit einer aktivierenden T-DNA. Die resultierende deregulierte Expression eines „getaggten“ Gens, *BRS1*, bewirkt die Unterdrückung des *BRI1*-Phänotyps. *BRS1* kodiert für eine Serin-Carboxypeptidase. Van der Fits *et al.* (2001) stellen eine „activation tagging“-Methode in *Catharanthus roseus*-

Suspensionskulturen vor, welche mit einer aktivierten T-DNA transformiert werden. Mittels dieser wurde von van der Fits und Memelink (2000) ORCA3, ein transkriptionaler Faktor des Jasmonat-Signaltransduktionswegs identifiziert.

### **1.3.2.2. Mutagenese durch Integration von Transposons**

Eine Strategie des Markierens von Genen durch Transposons („transposon tagging“) zur Erzeugung dominanter Mutationen in *Arabidopsis* wurde von Wilson *et al.* (1996) entwickelt. Ein *Dissociation (Ds)*-Element mit einem CaMV 35S-Promotor, der über die Grenzen des *Ds*-Elements hinaus transkribierend wirkt, wird dazu verwendet. Homozygote Pflanzen mit einer T-DNA, die eine Fusion aus dem CaMV 35S-Promotor mit dem *Activator (Ac)*-Transposase-Gen enthält, wird mit homozygoten Pflanzen mit einer T-DNA inklusive obigem *Ds*-Konstrukt gekreuzt. Die F<sub>1</sub>-Generation wird geselbstet. F<sub>2</sub>-Samen werden auf entsprechender Selektion ausgekeimt und wachsende Pflanzen wiederum geselbstet. Die F<sub>3</sub>-Generation wird nach Mutanten mit gewünschtem Phänotyp durchsucht. Die Insertion des *Ds*-Elements in der Nähe eines Gens bringt die Genexpression unter die Kontrolle des 35S-Promotors. Die ursprünglichen Transkriptionssignale des Gens verlieren durch die Anwesenheit des starken 35S-Promotors dabei meist ihre Wirkung. Dieses System verhält sich analog zu dem in Retroviren gefundenen Mechanismus und den verwandten Retrotransposons (Payne *et al.*, 1982). Auf diese Weise wurde durch Überexpression eine semidominante Mutation des *Arabidopsis*-Gens *TINY* hervorgerufen. Das *TINY* Protein zeigt Homologien zu einer Klasse pflanzlicher Transkriptionsfaktoren, die bei der Blütenentwicklung von *Arabidopsis* und bei der Regulation der Genexpression während der Ethylen-Antwort in Tabak eine Rolle spielen. Unter Verwendung derselben Methode erzeugte Schaffer *et al.* (1998) eine dominante Mutation, *late elongated hypocotyl (lhy)*, in *Arabidopsis*, die den circadianen Rhythmus der Genexpression und der Blattbewegungen zerstört. Außerdem wird in der Mutante der Blühvorgang unabhängig von der Photoperiode ausgelöst. *LHY* kodiert für einen MYB-Transkriptionsfaktor. Fridborg *et al.* (1999) benutzten ebenfalls das oben beschriebene „*Ac/Ds* transposon tagging“-System um eine semidominante Mutation, *short internodes (shi)*, in *Arabidopsis* zu bewirken. Das *SHI* Genprodukt ist ein negativer Regulator im Giberillin-Signaltransduktionsweg und besitzt Homologien zu Zink-Finger-Proteinen. Es verursacht kurze Infloreszenzstiele und eine vermehrte Anzahl von früher auftretenden Blüten.

Suzuki *et al.* (2001) konstruierten ein transponierbares Element basierend auf einem sich selbst stabilisierenden *Ac*-Derivat (Schmitz und Theres, 1994), um eine neue Methode zur Erzeugung dominanter Mutationen zu etablieren. In diesem *Ac*-Element sind zwei CaMV 35S-Promotoren bzw. vier Verstärkerelemente des 35S-Promotors inseriert. Durch die Anordnung der beiden 35S-Promotoren an den Enden des Elements können benachbarte Pflanzengene transkribiert werden. Die in der Mitte des Transposons lokalisierten 35S-Verstärkerelemente, können hingegen Pflanzen-eigene Promotoren in der Nähe der Insertionsstelle aktivieren. *N. tabacum*-Pflanzen werden mit einer T-DNA transformiert, die dieses Konstrukt enthält. In der ersten Pflanzengeneration findet die Insertion des transponierbaren Elements an beliebiger Stelle im Pflanzengenom statt. Erneutes Ausschneiden wird dadurch verhindert, daß die Transposase außerhalb, deren Promotor aber innerhalb des „springenden“ Teils lokalisiert ist. Die Reisolation des *Ac*-Derivats mit flankierender Pflanzen-DNA wird durch die Anwesenheit eines *E. coli*-Replikationsursprungs ermöglicht. Auch in diesem System werden mittels „plasmid rescue“ markierte und dereguliert exprimierte Gene identifiziert.

#### **1.4. Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist die erneute Etablierung eines Genmarkierungs-Systems mit Hilfe einer aktivierenden T-DNA unter Verwendung von Tabak-Mesophyll-Protoplasten. Nachdem Zweifel an der Funktionalität dieser Methode auftraten (Schell *et al.*, 1999) war die Notwendigkeit zur Überprüfung des Verfahrens gegeben. Dazu sollte eine bekannte Gensequenz im Pflanzengenom mit einer geeigneten T-DNA markiert, aktiviert und reisoliert werden.

Mesophyll-Protoplasten aus transgenen Tabakpflanzen, welche ein promotorloses und somit inaktives Markergen (Neomycinphosphotransferase, NPTII) in ihrem Genom enthalten, sollten zur Kokultivation mit *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt werden. Das Kanamycin-Resistenz-Gen sollte durch die Integration eines T-DNA-Konstrukts aktiviert werden. Dies erfordert die Verwendung eines T-DNA-Vektors, an dessen rechter „border“-Sequenz ein 35S-Promotor inseriert ist. Nach erfolgreicher Integration dieser T-DNA in der Nähe des NPTII-Gens soll dieses durch den 35S-Promotor transkribiert werden.



Es wird erwartet, daß Transformanden mit einer aktivierenden T-DNA-Markierung in Nachbarschaft des Neomycinphosphotransferase-Gens einen Kanamycin-resistenten Phänotyp ausbilden. Diese sollten durch Selektion auf Kanamycin-haltigem Medium aus anderen Transformanden detektiert werden. Zum Beweis der Ausbildung der Kanamycin-Resistenz durch das unter der Kontrolle des 35S-Promotors stehende Genprodukts des NPTII-Gens mußte das reisolierte DNA-Plasmid folglich auch in *E. coli*-Zellen einen Kanamycin-resistenten Phänotyp hervorrufen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Pflanzen

*Nicotiana tabacum*                      Petit Havana SR1 (Maliga *et al.* 1973)

#### 2.1.2. Bakterienstämme

##### *Escherichia coli*

##### Genotyp

DH5 $\alpha$                                       F<sup>-</sup>  $\phi$ 80d *lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1*  
*hsdR17* (*r<sub>k</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>k</sub><sup>+</sup>*) *supE44 thi-1  $\lambda$ <sup>-</sup> J gyrA96 relA1*  
(Hanahan, 1985; GIBCO BRL, Eggenstein)

SCS110                                      *rpsL* (Str<sup>r</sup>) *thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm*  
*supE44  $\Delta$ (lac-proAB)* [F<sup>+</sup> *traD36 proAB lac<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15]  
(STRATAGENE, Heidelberg)

XL1-Blue                                      *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1*  
*lac*[F<sup>+</sup>*proABlac<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15Tn10(Tet<sup>r</sup>)]  
(Bullock *et al.*, 1987; STRATAGENE, Heidelberg)

##### *Agrobacterium tumefaciens*

##### Genotyp

GV3101(pMP90RK)                      C58C1 pMK90RK, Rif<sup>r</sup>, Gm<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>  
(Koncz und Schell, 1986)

#### 2.1.3. Oligonukleotide

Die verwendeten PCR- und Sequenzierprimer wurden von der Firma METABION (Martinsried) synthetisiert und in entsalztem Zustand geliefert (Tabelle 1). Das Primerdesign erfolgte unter weitgehender Vermeidung größerer palindromischer Sequenzbereiche. Korrespondierende Primerpaare besaßen möglichst eine identische Schmelztemperatur. Als Standardsequenzierprimer wurden Oligonukleotide der „Automatischen DNS-Isolierungs- und Sequenzierungs-“ (ADIS)-Gruppe verwendet.

**Tabelle 1.** Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz in 5'→3'-Richtung
35S-1	ACA TGG TGG AGC ACG ACA CTC
35S-2	AGA GGA AGG GTC TTG CGA AGG
Sul-1	ATG GTG ACG GTG TTC GGC ATT C
Sul-2	ACG CAT GAT CTA ACC CTC GGT C
NPT1	GGC CGA GCT CGG GAA TTC GAT CAT GAG CGG AG
NPT2	GGG GCT CGA GCT ATA ACA ATC AAG C
polyA	CCA TTA GAA TGA ACC G
Kan-1	CGC ATG ATT GAA CAA GAT GG
Kan-2	CGC TCA GAA GAA CTC GTC
35St	GTG GAT TGA TGT GAT ATC TCC
7-1	TCT GGC TCC GCT TTT ATA GG
7-2	TGC CCA TTC GAC CAC CAA GC
7-3	TCC TTA CCG CCG GTT TCG G
7-4	TCA GCC GCG GGT TTC TGG
7-5	TCA GTG CGT CCG TCG CGC
unis	GTA AAA CGA CGG CCA GT
revs	AAC AGC TAT GAC CAT G
RT-NPTI	CTC CGG CCG CTT GGG TGG AG
RT-NPTII	CGC TGC GAA TCG GGA GCG GC
Nos-1	TCC CCC GGG AAT TCT GAT CAT GAG CGG AG
Nos-2	TCC CCC GGG CTC TCT CCA ATC AG

#### 2.1.4. Vektorplasmide

pAC106	Dr. Bernd Reiss, unveröffentlicht
pBI6c1-1	Fang und Hirsch, 1998
pCVHPT	Fritze, 1992
pK2L610	Depicker <i>et al.</i> 1985
pTAG	Marion Stoll, diese Arbeit

pUC19	GIBCO BRL, Eggenstein
pUCHN <sup>-</sup>	Marion Stoll, diese Arbeit

### 2.1.5. Molekularmassenstandards

Zur Bestimmung der Größe verwendeter DNA wurden folgende Standards verwendet.

1 kb-DNA-Leiter	NEW ENGLAND BIOLABS, Schwalbach
$\lambda$ -DNA/ <i>Hind</i> III- <i>Eco</i> RI-Marker	ROCHE, Mannheim

### 2.1.6. Enzyme und Proteine

#### 2.1.6.1. Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma ROCHE (Mannheim) bezogen.

#### 2.1.6.2. Modifizierende Enzyme

Alkalische Phosphatase, bakteriell	GIBCO BRL, Eggenstein
Cellulase Onozuka R10	SERVA, Heidelberg
DNase I, RNase frei	ROCHE, Mannheim
Macerozym R10	SERVA, Heidelberg
<i>Pfu turbo</i> DNA Polymerase	STRATAGENE, Heidelberg
Proteinase K	ROCHE, Mannheim
RNase A, DNase frei	QIAGEN, Hilden
SUPERSCRIPT Reverse Transkriptase	GIBCO BRL, Eggenstein
T4-DNA-Ligase	ROCHE, Mannheim

#### 2.1.7. Reagenziensysteme

QIAPREP SPIN Plasmid Kit	QIAGEN, Hilden
ENDOFREE Plasmid Mega Kit	QIAGEN, Hilden
QIAQUICK PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
DNEASY PLANT Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Prime-It II Random Primer Labeling Kit	STRATAGENE, Heidelberg
Agarose Gel Extraction Kit	ROCHE, Mannheim
<i>TaqPlus</i> ® Long PCR System	STRATAGENE, Heidelberg

## 2.1.8. Chemikalien

### 2.1.8.1. Feinchemikalien

Die verwendeten Laborchemikalien wurden im allgemeinen von folgenden Firmen in „p. a.“-oder „reinst“-Qualität bezogen:

MERCK, Darmstadt

SERVA, Heidelberg

SIGMA, München

### 2.1.8.2. Sonstige Materialien

[ <sup>3</sup> H] Thymidin	BIOTREND, Köln
0,22 µm MILLEX-GV Filtereinheiten	MILLIPORE, Bedford, USA
Bacto-Agar	DIFCO, Detroit, USA
Bacto-Trypton	DIFCO, Detroit, USA
BSA	ROCHE, Mannheim
Cefotaxim (Claforan)	CALBIOCHEM, Frankfurt/Main
Ficoll	MERCK, Darmstadt
Formamid	GIBCO BRL, Eggenstein
Guanidinhydrochlorid	GIBCO BRL, Eggenstein
Hefe-Extrakt	DIFCO, Detroit, USA
Kodak-X-Omat Röntgenfilme	EASTMAN KODAK, Rochester, USA
Membranfilter (Hybond N <sup>+</sup> )	AMERSHAM BUCHLER, Braunschweig
MicroSpin <sup>TM</sup> G-25 Säulen	AMERSHAM. BUCHLER, Braunschweig
Radiochemikalien	AMERSHAM BUCHLER, Braunschweig
RNASEOUT RNase-Inhibitor, rekombinant	GIBCO BRL, Eggenstein
SEAPLAQUE Agarose	FMC, Rockland, USA

## 2.1.9. Medien

### 2.1.9.1. Medien für Pflanzen- und Zellkultur

Das Murashige & Skoog Pflanzen-Medium (Murashige und Skoog, 1962) inklusive Vitaminmischung und MES ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ), sogenanntes **MS-Medium**, wurde von DUCHEFA (Haarlem, Niederlande) bezogen und nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der pH wurde mit KOH auf 5,7 eingestellt. Fest-Medien enthielten Agar-Agar ( $7,0 \text{ g l}^{-1}$ ) und wurden autoklaviert. Flüssig-Medien wurden sterilfiltriert.

Dieses MS-Basismedium enthielt je nach Verwendungszweck nachfolgende Saccharose-Konzentrationen.

1. Samenkeimung und Pflanzenkultivierung	0,03 M	<b>MS1-Medium</b>
2. Sproß- und Kallusinduktion, sowie zur Kalluskultivierung	0,09 M	<b>MS3-Medium</b>
3. Protoplastenkultivierung	0,4 M	<b>MS 0,4 M</b>
	0,03 M	<b>Mannitol-MS</b>

Das Mannitol-MS-Medium enthielt zusätzlich 0,6 M Mannitol um die benötigte Osmolarität von 690 mOsmol/kg in der Protoplastenkultur zu gewährleisten. Die Einstellung der Osmolarität der Medien MS 0,4 M und Mannitol-MS erfolgte mittels des OSMOMAT 030 (GONOTEC, Berlin).

### 2.1.9.2. Medien für Bakterienkulturen

LB (Sambrook *et al.*, 1989)

YEB (Sambrook *et al.*, 1989)

Fest- und Flüssig-Medien wurden autoklaviert und je nach Experiment mit dem entsprechenden Antibiotikum supplementiert.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Pflanzen- und Gewebekultur

Alle hier beschriebenen Arbeiten wurden in steriler Atmosphäre unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Alle Lösungen wurden autoklaviert oder, sofern temperaturempfindlich, sterilfiltriert. Gefäße wurden entweder durch Autoklavieren oder bei trockener Hitze bei 180°C sterilisiert.

#### 2.2.1.1. Sterilisation der Samen

*N. tabacum*-Samen wurden in Ethanol (70%) für 2 min. und danach in einer Natriumhypochlorit-Lösung für 15 min. oberflächensterilisiert. Danach wurden diese dreimal mit sterilem Aqua dest. gewaschen und getrocknet.

<b>Natriumhypochlorit-Lösung</b>	10% NaOCl
	0,1% SDS

#### 2.2.1.2. Pflanzenkultur

*N. tabacum*-Samen wurden unter sterilen Bedingungen auf MS1-Medium in Petrischalen in einem Kulturraum bei 22°C und einer sechzehnstündigen Photoperiode bei 700-900 Lux zur Keimung gebracht. Nach vier Wochen wurden die Keimlinge in Magentadosen (SIGMA, Deisenhofen) überführt und unter gleichen Bedingungen weiterkultiviert.

#### 2.2.1.3. Isolierung von *N. tabacum*-Mesophyll-Protoplasten

Blätter von acht Wochen alten, sterilen *N. tabacum*-Pflanzen wurden in ca. 1 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und für 20 h bei 26°C in Enzymlösung (siehe unten) inkubiert. Dabei wurden die Blätter von sechs Pflanzen in 50 ml Enzymlösung verdaut. Dieser Ansatz wurde dann für 10 min. bei 50 min<sup>-1</sup> und bei RT geschüttelt und danach sofort durch ein Sieb (100 µM Porengröße) gefiltert, um die Protoplasten aus dem Gewebeverband zu lösen. Die resultierende Protoplasten-Suspension wurde in 50 ml PP-Röhrchen (FALCON, Franklin Lakes, NJ., USA) überführt und zentrifugiert (80×g, 10 min., RT in einer Eppendorf Centrifuge 5804R mit Swing-out Rotor). Dabei flottieren intakte Protoplasten an die Oberfläche, Zellrückstände sinken in Form eines Pellets ab. Dieses Pellet sowie die Lösung unterhalb der Protoplasten wurde durch eine

Glaskapillare und eine peristaltische Pumpe (ECONO PUMP, BIO-RAD, München) abgesaugt. Die Protoplasten wurden mit 50 ml W5 gewaschen und erneut zentrifugiert (80×g, 10 min., RT). Nach der Zentrifugation befinden sich die Protoplasten im Pellet. Der Überstand wurde verworfen und die isolierten Pflanzenzellen in 50 ml MS 0,4 M vorsichtig resuspendiert. Die exakte Zellzahl wurde mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und auf eine Dichte von  $2 \times 10^5$  Protoplasten  $\text{ml}^{-1}$  mit MS 0,4 M eingestellt.

**Enzymlösung**            0,5% Cellulase Onozuka R10  
                                 0,2% Macerozym R10  
                                 in MS 0,4 M,  
                                 pH 5,7  
                                 sterilfiltrieren (0,22  $\mu\text{m}$ , GP Express Membran, MILLIPORE,  
                                 Bedford, USA)

**W5**                        154 mM NaCl  
                                 125 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
                                 5 mM KCl  
                                 5 mM Glucose  
                                 pH 5,7  
                                 sterilfiltrieren (s. o.)

#### **2.2.1.4. Protoplastenkultivierung und Regeneration**

Frisch isolierte Protoplasten wurden in MS 0,4 M mit NAA (0,5  $\mu\text{M}$ ) und BAP (2,2  $\mu\text{M}$ ) zwei Tage in Dunkelheit bei 26°C und anschließend im Kulturraum bei 22°C mit einer Photoperiode von 16 h bei 700-900 Lux kultiviert.

Zur Regeneration von Kalli wurden die Zellen nach fünf Tagen in SEAPLAQUE-Agarose eingebettet. Dabei war diese in MS 0,4 M mit NAA (0,5  $\mu\text{M}$ ) und BAP (2,2  $\mu\text{M}$ ) gelöst, wobei die Endkonzentration der Agarose 0,4% betrug. Nach dem Erstarren wurden die Agarosescheiben auf 80 ml Agar-haltiges MS3-Medium mit NAA (0,5  $\mu\text{M}$ ) und BAP (2,2  $\mu\text{M}$ ) transferiert. Die eingebetteten Zellen wurden durch Nylon-Netze vom darunterliegenden Medium getrennt. Mit Hilfe dieser Netze konnten die eingebetteten Mikrokalli wöchentlich auf frisches MS3-Medium mit NAA (0,5  $\mu\text{M}$ ) und BAP (2,2  $\mu\text{M}$ ) überführt werden.



#### 2.2.1.5. [<sup>3</sup>H] Thymidin-Inkorporationsassay

50 µl einer verdünnten [<sup>3</sup>H] Thymidin-Lösung (5 µCi) wurden zu einer fünf Tage alten flüssigen Protoplastenkultur (5 ml, Kapitel 2.1.4.) gegeben. Die verdünnte [<sup>3</sup>H] Thymidin-Lösung (100 µCi ml<sup>-1</sup>) wurde aus einer 1 mCi ml<sup>-1</sup> Stammlösung (BIOTREND, Köln) hergestellt, indem diese 1:10 mit einer sterilen nichtmarkierten Thymidin-Lösung (10<sup>-5</sup> M) vermischt wurde. Die Markierung der Zellen erfolgte für 24 h. Zur Ernte der Zellen wurden diese 1:1 mit W5 verdünnt und in einer Hettich Rotofix Zentrifuge pelletiert (1000×g, 7 min., RT). Die Zellen wurden in 1 ml eiskalter TCA-Lösung (5%) resuspendiert und für 30 min. auf Eis inkubiert. Um die säurelösliche Restradioaktivität zu entfernen, wurden die Zellen nochmals pelletiert und mit TCA (5%) sowie mit Ethanol (100%) gewaschen. Das gereinigte Pellet wurde in 0,5 ml 0,1 M NaOH-Lösung, die mit 0,2% SDS versetzt war, resuspendiert und für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die in die DNA inkorporierte Radioaktivität wurde unter der Verwendung eines sauren Szintillationscocktail im Szintillationszähler gemessen. Der Einbau von [<sup>3</sup>H] Thymidin in DNA war die Bemessungsgrundlage für die Ermittlung der Zellteilung.

#### 2.2.1.6. PEG-Transformation von *N. tabacum*-Mesophyll-Protoplasten mit anschließender Regeneration transgener Pflanzen

Frisch isolierte Protoplasten-Pellets (Kapitel 2.1.3.) wurden so in MaMg-Puffer resuspendiert, daß Aliquots von jeweils 2×10<sup>6</sup> Zellen pro Transformation in Röhrchen (NUNC, Wiesbaden) überführt werden konnten. Die Röhrchen wurden mit MaMg-Puffer aufgefüllt und die Protoplasten abzentrifugiert (200×g, 5 min., RT in Hettich Rotofix Zentrifuge). Die in je 0,5 ml MaMg-Puffer aufgenommenen Protoplasten-Pellets wurden für 5 min. bei 45°C erhitzt und danach für 5 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA (20 µg Transformations-DNA und 100 µg pUC19-Plasmid als Carrier-DNA) zugegeben und 0,5 ml PEG-Lösung unter leichtem Schütteln langsam zupipettiert. Die so behandelten Protoplasten wurden für 25 min. bei RT inkubiert. Danach wurde jede Probe mit 5 ml W5 aufgefüllt, vorsichtig geschüttelt und abzentrifugiert (200×g, 5 min., RT). Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnten die Zellen in je 10 ml MS 0,4 M mit NAA (0,5 µM) und BAP (2,2 µM) aufgenommen werden.

Die weitere Kultivierung erfolgte wie bereits in Kapitel 2.1.4. beschrieben. Nach einer Woche wurde das entsprechende Selektionsantibiotikum zugegeben. Erste grüne Kalli wurden nach Erreichen einer Größe von ca. 3 mm Durchmesser aus dem Gewebeverband gelöst, auf MS3-Medium mit NAA (0,5  $\mu\text{M}$ ), BAP (2,2  $\mu\text{M}$ ) und Selektionsantibiotikum vereinzelt, und dann weiterkultiviert.

Bei einer Entwicklung von Sprossen aus den Kallusgeweben wurden diese herausgetrennt und zur Wurzelinduktion in Magentadosen mit Hormon-freiem, aber Antibiotikum-haltigen MS1-Medium umgesetzt.

<b>MaMg-Puffer</b>	0,8 M Mannitol 30 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,2% MES pH 5,6 sterilfiltrieren, bei RT lagern, 1 Monat haltbar
<b>PEG-Lösung</b>	PEG 1450 (40%) in MaMg-Lösung pH 5,6 - 7,0 autoklavieren, immer frisch verwenden

#### **2.2.1.7. Transformation von *N. tabacum*-Mesophyll-Protoplasten mit *A. tumefaciens***

Frisch isolierte Protoplasten wurden in MS 0,4 M mit NAA (0,5  $\mu\text{M}$ ) und BAP (2,2  $\mu\text{M}$ ) und einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Protoplasten  $\text{ml}^{-1}$  im Dunkeln bei 26°C kultiviert. Nach zwei Tagen begann die Kokultivierung der Pflanzenzellkultur mit einer *A. tumefaciens*-Suspension (100 Bakterien pro 1 Protoplast). Die  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  der Bakterienkultur betrug 1,0. Nach zwei weiteren Tagen Inkubation im Dunkeln bei 26°C wurden die Zellen wie in Kapitel 2.1.4. beschrieben eingebettet. Dabei wurde das Wachstum der Bakterien durch die Zugabe von Cefotaxim (200  $\text{mg l}^{-1}$ ) zur Agarose-Pflanzenzell-Lösung gestoppt. Sämtliche Medien wurden zur weiteren Kultivierung mit Cefotaxim (200  $\text{mg l}^{-1}$ ) supplementiert.

Nach einer Woche wurde dem MS3-Medium zusätzlich das entsprechende Selektionsantibiotikum zugegeben. Regenerierte Sprosse wurden in Magentadosen mit MS1-Medium und dem jeweiligen Selektionsantibiotikum weiterkultiviert.

## 2.2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1. Standardtechniken

Die in der Molekularbiologie üblichen DNA-Klonierungstechniken wie Restriktion, Modifikation, Ligation und Transformation, sowie Gelelektrophorese, Fällung und Phenol-Extraktion von Nukleinsäuren wurden nach Standardprotokollen (Maniatis *et al.* 1989) unter Beachtung der Herstellervorschriften der jeweiligen Produkte durchgeführt. Aufgetrennte DNA-Proben im Agarose-Gel wurden in den Abbildungen fotografisch invers dargestellt.

Die Konzentration von DNA- bzw. RNA-haltigen Lösungen wurde gelelektrophoretisch mit Hilfe von Massenstandards oder durch spektrophotometrische Messung der OD<sub>260nm</sub> ermittelt. Reinheit und Qualität der Nukleinsäurepräparationen wurde durch Bestimmung des OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub>-Verhältnisses kontrolliert.

### 2.2.2.2. DNA-Isolierung aus Pflanzengewebe

Genomische Pflanzen-DNA wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Dellaporta *et al.* (1983) isoliert. Hierbei wurden 2 g Blattmaterial unter flüssigem Stickstoff gemörsert und in 15 ml Extraktionspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml SDS-Lösung (20%) und Inkubation für 10 min. bei 65°C wurde die DNA durch Hinzufügen von 5 ml Kaliumacetat (5 M) und anschließender Inkubation (20 min., 0°C) gefällt. Es folgten Zentrifugation (15 min., 4000 min<sup>-1</sup> in einer BIOFUGE 13, Rotor # 3757, HERAEUS Sepatech), Filtration durch Miracloth und Präzipitation mit 20 ml 2-Propanol durch Rollen bei RT. Die DNA wurde mit einem Glasstab aus der Interphase aufgenommen, zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 1 ml TE über Nacht bei 4°C resuspendiert. Die Lösung wurde dann mit 100 ng RNase A für 30 min. bei 37°C inkubiert und mit 1 ml STE sowie 0,1 mg Proteinase K versetzt. Nach einer Inkubation für 20 min. bei 48°C und zweimaliger Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) folgte eine Zentrifugation (10 min., 4000 min<sup>-1</sup>, RT). Die DNA wurde dann aus der oberen Phase mit 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2 Volumen Ethanol (100%) für 1 h bei -20°C gefällt und abzentrifugiert (10 min., 4000 min<sup>-1</sup>, 4°C). Das Pellet wurde zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde die DNA erneut in TE resuspendiert und mit Natriumacetat

gefällt. Nach dem Abzentrifugieren, zweifachem Waschen mit Ethanol (70%) und Trocknen wurde die DNA in TE aufgenommen und bei 4°C gelagert.

<b>Extraktionspuffer</b>	100 mM Tris-HCl pH 8,0 50 mM EDTA pH 8,0 500 mM NaCl 10 mM 2-Mercaptoethanol
<b>TE</b>	20 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
<b>STE</b>	80 mM Tris-HCl 40 mM EDTA 2% SDS

Geringe Mengen bis zu 20 µg DNA wurden mit Hilfe des DNEASY PLANT Mini Kit (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

### 2.2.2.3. Plasmid-Isolierung aus Bakterien

Für die Plasmid-Isolierung wurden *E. coli* Kulturen 15-18 h bei 37°C in LB-Medium mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums angezogen. Die DNA Präparationen wurden mit dem QIAPREP SPIN Plasmid Kit (QIAGEN, Hilden) oder dem ENDOFREE Plasmid Mega Kit (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.2.4. RNA-Isolierung aus Pflanzengewebe

Alle RNA-Arbeiten wurden mit in 0,1%-igem Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelten Materialien und Lösungen durchgeführt (Maniatis *et al.*, 1989).

Gesamt-RNA wurde nach der Methode von Logemann *et al.* (1987) präpariert. 0,5 g Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff zu Pulver gemörsert und in 2 ml Guanidin-Puffer aufgenommen. Nach dem Auftauen wurde die Suspension zentrifugiert (10 min., 10.000 min<sup>-1</sup>, 4°C in einer BIOFUGE 13, Rotor # 3757, HERAEUS Sepatech) und der Überstand mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Es folgte eine Fällung der Nucleinsäuren mit 0,2 Volumen 1 M Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol (100%) bei -70°C. Das nach

erneuter Zentrifugation sedimentierte RNA-Pellet wurde zunächst mit 1 ml 3 M Natriumacetat pH 5,2 und danach zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen. Die gereinigte RNA wurde zuletzt getrocknet, in H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -70°C gelagert.

<b>Guanidin-Puffer</b>	8 M Guanidinhydrochlorid
	20 mM MES
	20 mM EDTA
	50 mM 2-Mercaptoethanol

#### **2.2.2.5. Automatische DNA-Sequenzierung**

DNA-Sequenz-Analysen wurden von der ADIS-Gruppe mit Hilfe eines ABI PRISM 377 und 3700 Sequenzgerätes (APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt) durchgeführt. Es wurden BIGDYE-Terminator-Methoden verwendet. Vorgefertigte Reagenzien stammten von APPLIED BIOSYSTEMS. Oligonukleotide wurden von METABION (Martinsried) bezogen.

#### **2.2.2.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Sämtliche analytischen und präparativen PCR-Reaktionen wurden in dünnwandigen 500 µl-Reaktionsgefäßen in einem programmierbaren Heizblock mit Heizdeckel (GENEAMP PCR System 2400, PERKIN ELMER, Shelton, USA) ohne Zusatz von Mineralöl durchgeführt. Präparative DNA-Amplifikationen erfolgten unter den folgenden Reaktionsbedingungen:

cloned <i>Pfu</i> DNA Polymerase Reaktionspuffer	1×
dNTP-Mix	je 0,2 mM
Matrizen-DNA	10-200 ng
5'- und 3'-Primer	je 0,2 mM
<i>Pfu Turbo</i> DNA Polymerase	2,5 U
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Die Polymerase wurde nach der Heiß-Start-Technik am Ende des initialen zweiminütigen Denaturierungsschrittes von 95°C zugegeben. Die folgenden Denaturierungs- und Hybridisierungsphasen wurden auf jeweils 1 min. eingestellt, wobei die Hybridisierungstemperatur etwa 5°C unter der Primer-Schmelztemperatur lag. Für die Berechnung der

Elongationsdauer wurde eine durchschnittliche Syntheserate von 1000 Nukleotiden pro Minute zu Grunde gelegt. Nach 30 Zyklen wurde die Kettenreaktion durch einen Elongationsschritt von 10 min. beendet.

#### **2.2.2.7. RNA (RT)-PCR**

Der Nachweis der Expression der Neomycinphosphotransferase in der genmarkierten Pflanze 2K<sub>r</sub> geschah mit Hilfe einer reversen Transkriptionsreaktion, der ein separater Nachweis von einzelsträngiger DNA mittels PCR folgte. Zunächst wurde die zu untersuchende Gesamt-RNA mit Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primern für 10 min. bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 0,5 mM dNTP-Mix (je Nukleotid), 5 U RNase-Inhibitor, 2 U Reverser Transkriptase und entsprechendem Puffer wurde der 10 µl-Ansatz eine Stunde bei 42°C inkubiert. Durch Erwärmen auf 93°C (5 min.) und rasches Abkühlen auf Eis wurden die Reaktion gestoppt und verbleibende RNA/DNA-Hybride denaturiert. 1% der entstandenen einzelsträngigen DNA wurde nach Zugabe der beiden Primer RT-NPTI und RT-NPTII in einem nachfolgendem PCR-Schritt analog zu 2.2.6. amplifiziert. Für jede einzelne Reaktion wurde ein identischer Ansatz ohne Reverse Transkriptase als Kontaminationskontrolle mitgeführt.

### 2.2.2.8. DNA-DNA-Hybridisierung „Southern Blotting“

#### „Southern Blot“-Transfer

Die Auftrennung der mit Restriktionsenzymen geschnittenen Pflanzen-DNA erfolgte in 1%-igen TAE-Agarose-Gelen (Maniatis *et al.*, 1989). Die Gele wurden nacheinander für 15 min. in 0,25 M HCl, für 30 min. in Denaturierungs-Lösung, für 30 min. in Renaturierungs-Lösung und für 10 min. in  $10 \times$  SSC inkubiert. Die Übertragung der DNA auf Nylon-Membranen (Hybond-N+, AMERSHAM, Braunschweig) erfolgte über Nacht mit  $20 \times$  SSC-Transferpuffer. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch Backen bei 80°C (2 Stunden).

<b>Denaturierungs-Lösung</b>	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
<b>Renaturierungs-Lösung</b>	0,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl pH 7,5
<b><math>20 \times</math> SSC</b>	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,5

#### Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zur Markierung von Sonden wurde die „random primed“ Methode nach Feinberg und Vogelstein (1983) verwendet. Dazu wurden jeweils 20 ng DNA nach den Angaben des Herstellers mit dem Prime-It II Random Primer Labeling Kit (STRATAGENE, Heidelberg) mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P dCTP] markiert. Freie Nukleotide wurden von der markierten DNA durch Auftrennung über eine MicroSpin<sup>TM</sup> G-25 Säule (AMERSHAM, Braunschweig) entfernt.

#### Hybridisierung

Membranen mit fixierter DNA wurden für 4 h bei 42°C in Vorhybridisierungspuffer inkubiert und anschließend in Hybridisierungspuffer überführt.

Die radioaktiv markierte Sonden-DNA wurde für 5 min. bei 100°C denaturiert und dem Hybridisierungspuffer zugefügt. Die Hybridisierung erfolgte für 16 h bei 42°C.

Alle Filter wurden anschließend mit steigender Stringenz gewaschen:

1. 2 × SSPE / 0,1% SDS 10 min., bei RT
2. 1 × SSPE / 0,1% SDS 30 min., bei 60°C
3. 0,1 × SSPE / 0,1% SDS 30 min., bei 60°C
4. 0,1 × SSPE kurz bei RT

Zur Detektion radioaktiver Signale wurden Kodak-X-Omat Röntgenfilm auf die Membran gelegt und bei -70°C exponiert.

Um auch spezifisch gebundene Sonden-DNA von Membranen zu entfernen, wurden diese für 4 h bei 75°C in SDS (0,1%) gewaschen. Filter konnten so mehrfach hybridisiert werden.

<b>Vorhybridisierungspuffer</b>	6 × SSPE 5 × Denhardt-Lösung 0,5% SDS 0,1 mg l <sup>-1</sup> Lachssperma-DNA 50% Formamid
<b>Hybridisierungspuffer</b>	6 × SSPE 0,5% SDS 0,1 mg l <sup>-1</sup> Lachssperma-DNA 50% Formamid
<b>SSPE</b>	3 M NaCl 200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O 20 mM EDTA
<b>50 x Denhardt-Lösung</b>	1% Ficoll 1% BSA 1% Polyvinylpyrrolidon



### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Effekt verschiedener Auxin- und Cytokinin-Konzentrationen auf die Zellteilung von Tabak-Mesophyll-Protoplasten in Flüssigkultur

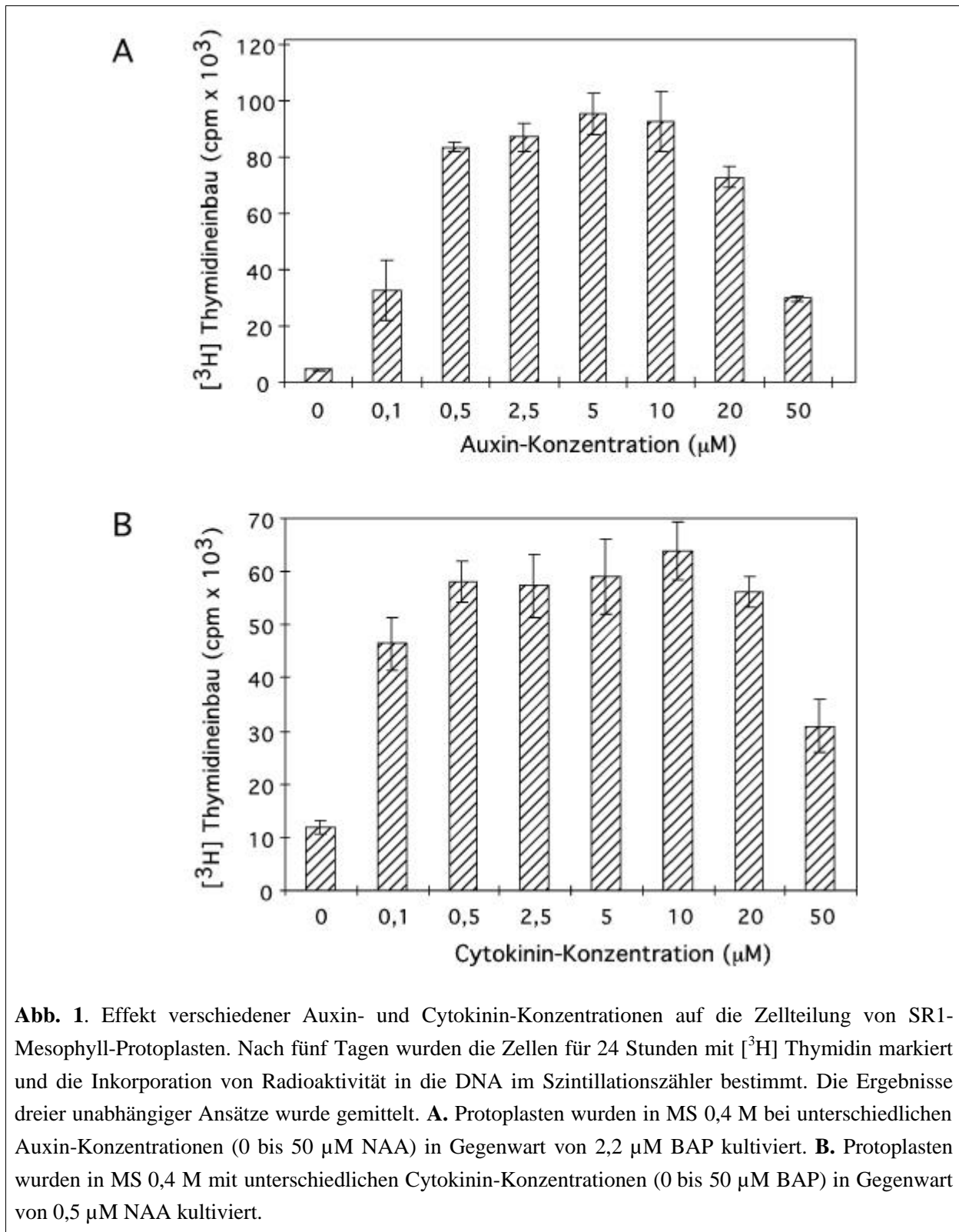
Um optimale Hormonbedingungen in der Flüssigkultur von Protoplasten zu bestimmen, erfolgte die Kultivierung von SR1-Protoplasten zunächst bei unterschiedlichen Auxin-Konzentrationen (0 bis 50  $\mu\text{M}$  NAA) sowie einer konstanten Cytokinin-Konzentration von 2,2  $\mu\text{M}$  BAP. Ein maximaler [ $^3\text{H}$ ] Thymidineinbau, welcher als Maß für die Zellteilung dient, wurde für die Zellen in einem Bereich von 0,5 bis 10  $\mu\text{M}$  NAA gefunden (Abb. 1A). Bei einer konstanten NAA-Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  und unterschiedlichen BAP-Konzentrationen zeigten sich optimale Zellteilungsaktivitäten in einem Bereich von 0,5 bis 20  $\mu\text{M}$  des Cytokinins (Abb. 1B).

#### 3.2. Effekt verschiedener Saccharose-Konzentrationen auf die Zellteilung von Tabak-Mesophyll-Protoplasten

Saccharose kann zur Einstellung des osmotischen Werts eines Kulturmediums verwendet werden. Allerdings wird dieser Zucker auch von Mesophyll-Protoplasten als Kohlenstoff-Quelle verwendet. Daher ist es notwendig, die Wirkung verschiedener Saccharose-Konzentrationen auf die Protoplastenkultur zu überprüfen. Die Kultivierung von SR1-Protoplasten in MS-Medium mit 0,03 M Saccharose + 0,6 M Mannitol, dem sogenannten Mannitol-MS-Medium, ergab die stärkste [ $^3\text{H}$ ] Thymidin-Inkorporation (Tabelle 2).

**Tabelle 2.** Effekt verschiedener Saccharose-Konzentrationen auf die Zellteilung von SR1-Mesophyll-Protoplasten. Protoplasten wurden in MS-Medium bei einer jeweiligen Saccharose-Konzentration von 0,03 M bis 0,4 M in Gegenwart von 0,5  $\mu\text{M}$  NAA und 2,2  $\mu\text{M}$  BAP kultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen für 24 Stunden mit [ $^3\text{H}$ ] Thymidin markiert und die Inkorporation von Radioaktivität in die DNA im Szintillationszähler bestimmt. Die Ergebnisse dreier unabhängiger Ansätze wurden gemittelt.

Medium	cpm $\times 10^3$
MS 0,4 M Saccharose	40 $\pm$ 0,4
MS 0,1 M Saccharose + 0,4 M Mannitol	23 $\pm$ 0,4
MS 0,03 M Saccharose + 0,6 M Mannitol	68 $\pm$ 0,5



### 3.3. Regenerationsfähigkeit von Protoplasten in Abhängigkeit der Phytohormon-Konzentrationen

Zur Überprüfung der Regenerationsfähigkeit von Protoplasten in Abhängigkeit der Phytohormon-Konzentrationen wurden die Zellen unter den in Tabelle 3 dargestellten Bedingungen kultiviert. 12 Tage nach der Protoplasten-Isolierung wuchsen in allen Schalen deutlich ausgeprägte Mikrokalli ( $\varnothing$  1,5 mm). Schon während dieser Regenerationsphase war ein erhöhtes Kalluswachstum im Medium mit 0,5  $\mu$ M NAA und 2,2  $\mu$ M BAP erkennbar. Diese Kalli enthielten von Beginn an Chlorophyll. Im Alter von 18-19 Tagen waren unter diesen Bedingungen die ersten Sprößlinge im Kallusgewebe zu beobachten. Zur Regeneration von Kallusgewebe und Sprossen aus Protoplasten sind somit Phytohormon-Konzentrationen von 0,5  $\mu$ M NAA und 2,2  $\mu$ M BAP optimal. Unter den anderen getesteten Hormon-Konzentrationen entwickelten sich nur schwach grünlich gefärbte, in der Regel jedoch weiße Kalli. Zur Regeneration von Sprossen mußten diese erst auf Medium mit 0,5  $\mu$ M NAA und 2,2  $\mu$ M BAP überführt werden.

**Tabelle 3.** Regenerationsfähigkeit von SR1-Mesophyll-Protoplasten in Abhängigkeit der Phytohormon-Konzentrationen. Die Protoplasten wurden in Anwesenheit verschiedener Auxin- und Cytokinin-Konzentrationen in MS 0,4 M kultiviert, nach fünf Tagen eingebettet und anschließend auf MS3-Fest-Medium mit gleichen Hormon-Konzentrationen inkubiert. Letzteres wurde alle sieben Tage erneuert.

$\mu$ M NAA	1 $\mu$ M BAP	2,2 $\mu$ M BAP
0,1	+	+
0,5	++	+++
5	++	++
10	+	+

(+++), Kallus- und Sproßwachstum in hoher Plattierungsdichte; (++) , Kallus- und Sproßwachstum in mittlerer Plattierungsdichte; (+), geringes Kallus- und Sproßwachstum

### 3.4. Regenerationsfähigkeit von Protoplasten in Abhängigkeit des Mediums

Um eine effiziente Regenerationsfähigkeit von Protoplasten zu ermöglichen, wurden verschiedene Medien-Kombinationen während der einzelnen Phasen der Kultivierung getestet. Bei Verwendung von MS 0,4 M in der Flüssigkultur von Protoplasten bzw. zum Einbetten,

kombiniert mit MS3-Fest-Medium für die Inkubation der fixierten Zellen, wurde die beste Regenerationsfähigkeit vom Einzellstadium bis hin zum Sproßling beobachtet (Tabelle 4).

**Tabelle 4.** Regenerationsfähigkeit von SR1-Mesophyll-Protoplasten in Abhängigkeit des Mediums. Die Protoplasten wurden in Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$  NAA und 2,2  $\mu\text{M}$  BAP in zwei Flüssig-Medien unterschiedlicher Saccharose-Konzentration kultiviert und mit dem jeweiligen Medium nach fünf Tagen eingebettet. Die Agarosescheiben wurden entweder auf Fest-Medien mit unterschiedlichen Saccharose-Mengen inkubiert oder sie wurden von Flüssig-Medien umgeben. Die jeweiligen Medien wurden alle sieben Tage erneuert. Die Osmolarität dieser beider Medien (MS 0,4 M und Mannitol-MS) wurde während des Einbettens und danach alle sieben Tage reduziert. Dabei wurde die Saccharose-Konzentration des MS 0,4 M jeweils um 0,1 M bis zu einer Endkonzentration von 0,1 M verringert, die Mannitol-Konzentration des Mannitol-MS um 0,1 M bis zu einer Endkonzentration von 0,2 M Mannitol.

Medien zur Kultivierung der in Agarose fixierten Gewebekulturen	Medien zur Protoplastenkultivierung und zum Einbetten	
	MS 0,4 M	Mannitol-MS
MS3-Fest-Medium	+++	++
MS 0,4 M-Flüssig-Medium	+	+
MS 0,4 M-Fest-Medium	+	+
Mannitol-MS-Flüssig-Medium	+	+
Mannitol-MS-Fest-Medium	+	+

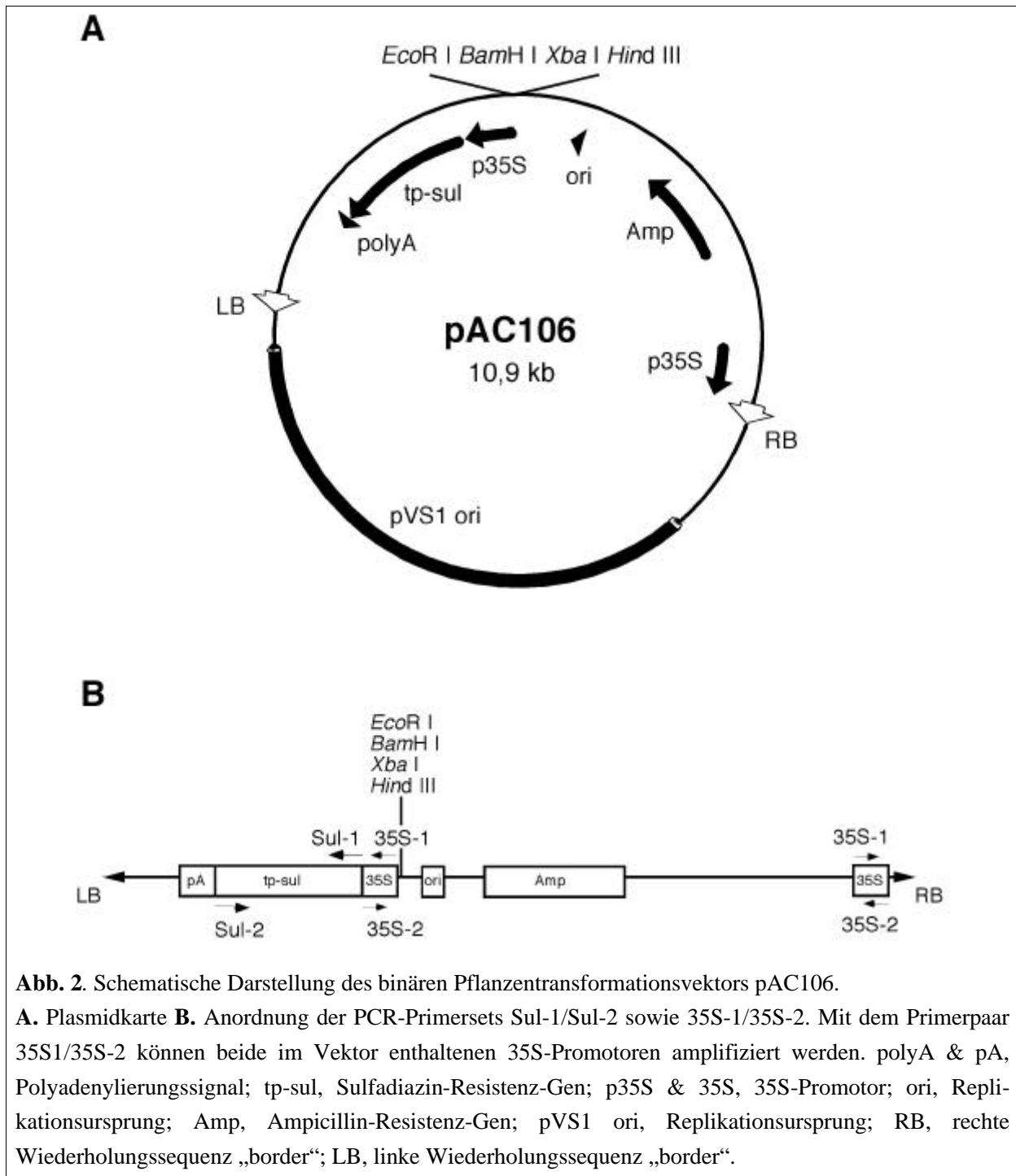
(+++), Kallus- und Sproßwachstum in hoher Plattierungsdichte; (++) , Kallus- und Sproßwachstum in mittlerer Plattierungsdichte; (+), geringes Kallus- und Sproßwachstum

### 3.5. Ermittlung der Transformationseffizienz von SR1-Mesophyll-Protoplasten mittels

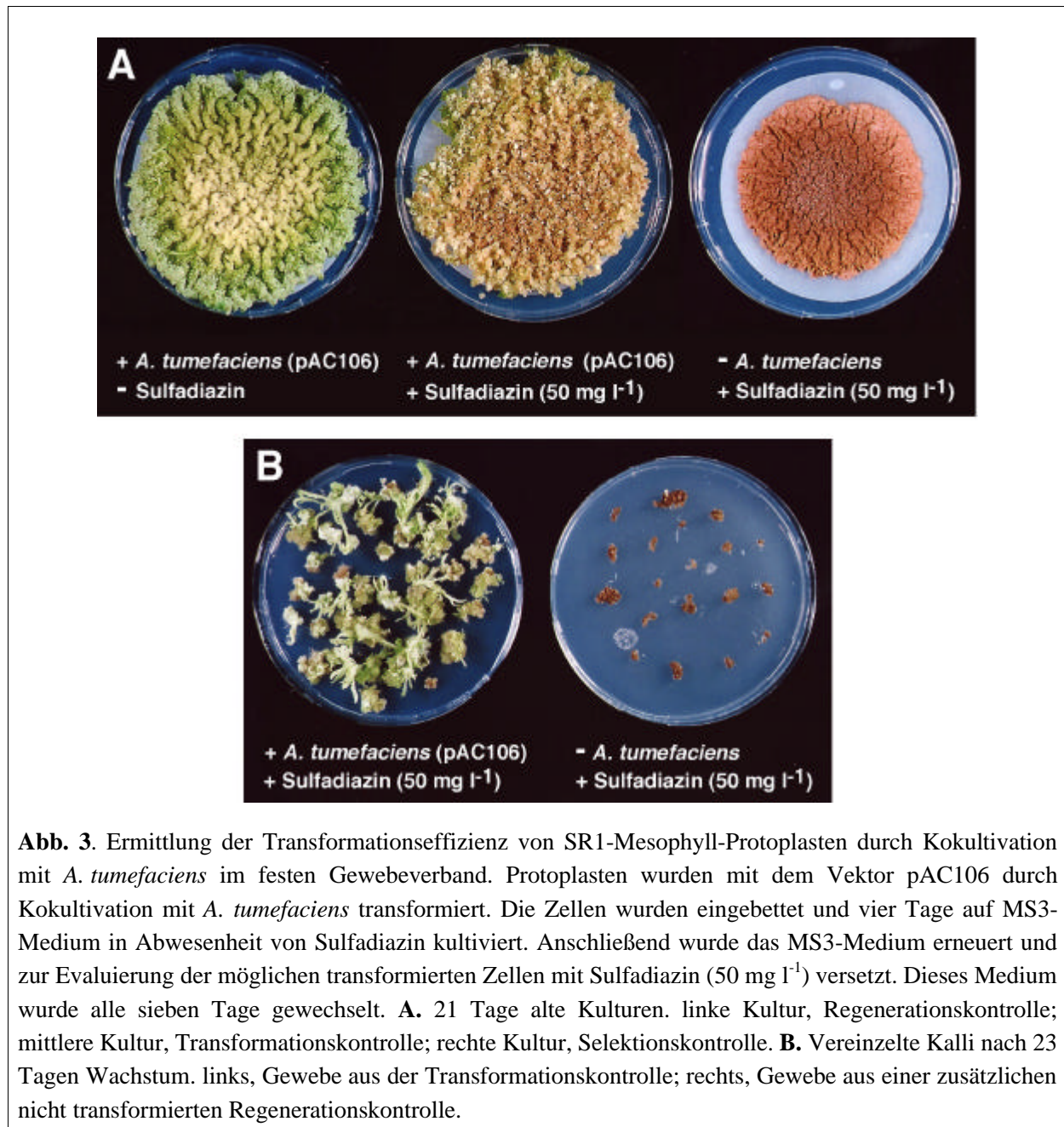
#### A. *tumefaciens* Kokultivation

*N. tabacum*-Protoplasten wurden durch Kokultivation mit *A. tumefaciens* mit dem Vektor pAC106 für die Pflanzentransformation (Abb. 2) transformiert. Die regenerierenden Zellen wurden auf Selektions-freiem Medium und Sulfadiazin-haltigem Medium ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) kultiviert. 30% der möglichen regenerierbaren Kalli entwickelten sich unter Selektionsdruck zu sproßbildendem Gewebe (Abb. 3A). Diese potentiell transgenen Kalli wurden auf Selektionsmedium vereinzelt und die weitere Regenerationsfähigkeit getestet. 95% dieser Kalliwachsen weiter und bildeten Sproßlinge (Abb. 3B und Tabelle 5). Sämtliche dieser

weiterkultivierten Sprößlinge entwickelten Wurzeln. 100% dieser Pflanzen waren stabil transformiert (Tabelle 5).



Zusätzlich wurde die Transformationsrate bestimmt, indem Kalli ( $\varnothing$  3 mm) aus mit *A. tumefaciens* kokultivierten, nichtselektionierten Zellen auf Sulfadiazin-haltiges Medium vereinzelt wurden. 45% der Kalli wuchsen unter dem Selektionsdruck weiter und bildeten Sprosse (Tabelle 6). 100% der weiterkultivierten Sprößlinge entwickelten Wurzeln. 100% dieser Pflanzen waren transgen (Tabelle 6).



**Tabelle 5.** Ermittlung der Transformationsrate von SR1-Mesophyll-Protoplasten mittels *A. tumefaciens* Kokultivation im festen Gewebeverband. Protoplasten wurden mit dem Vektor pAC106 durch Kokultivation mit *A. tumefaciens* transformiert. Die Zellen wurden eingebettet und für vier Tage auf MS3-Medium ohne Sulfadiazin-Selektion kultiviert. Danach wurde das MS3-Medium erneuert und zur Evaluierung der möglichen transformierten Zellen mit Sulfadiazin ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) versetzt. Sieben Tage nach Selektionsbeginn wurden Kalli auf Selektionsmedium vereinzelt und die weitere Regenerationsfähigkeit ermittelt. Durch PCR-Analyse mit dem Primerpaar Sul-1/Sul-2 wurde die Anwesenheit der T-DNA im Pflanzen-Genom überprüft.

Regenerationsstadium	Anzahl	DNA- Isolierung	Sulfadiazin PCR Produkt
Kallus	300	n.b.	n.b.
weiteres Wachstum	285	n.b.	n.b.
Sproßbildung	285	n.b.	n.b.
Sproß	30	n.b.	n.b.
wurzelbildende Sprosse	30	n.b.	n.b.
intakte regenerierte Pflanze	30	30	30
n.b., nicht bestimmt			

**Tabelle 6.** Ermittlung der Transformationsrate von SR1-Mesophyll-Protoplasten mittels *A. tumefaciens* Kokultivation durch Vereinzeln von primär nicht selektionierten Kalli. Protoplasten wurden mit dem Vektor pAC106 durch Kokultivation mit *A. tumefaciens* transformiert. Die Zellen wurden eingebettet und für sieben Tage auf MS3-Medium ohne Sulfadiazin-Selektion kultiviert. Mikrokalli wurden dann auf Selektionsmedium mit Sulfadiazin ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) vereinzelt und die weitere Regenerationsfähigkeit ermittelt. Durch PCR-Analyse mit dem Primerpaar Sul-1/Sul-2 wurde die Anwesenheit der T-DNA im Pflanzen-Genom überprüft.

Regenerationssatdium	Anzahl	DNA- Isolierung	Sulfadiazin PCR Produkt
Kallus	500	n.b.	n.b.
weiteres Wachstum	225	n.b.	n.b.
Sproßbildung	225	n.b.	n.b.
Sproß	30	n.b.	n.b.
wurzelbildende Sprosse	30	n.b.	n.b.
intakte regenerierte Pflanze	30	30	30
n.b., nicht bestimmt			

### 3.6. Konstruktion des Plasmids pUCHN<sup>-</sup>

Zur Erzeugung transgener Pflanzen, in deren Genom ein nicht transkribiertes Markergen (Neomycinphosphotransferase, NPTII) inseriert werden soll, wurde der Vektor pUCHN<sup>-</sup> konstruiert. Das Klonierungsschema in Abb. 4 verdeutlicht die beschriebene Strategie. Dazu wurde zuerst der Nopalinsynthase-Promotor (pNOS), der die Expression des NPTII-Gens ermöglicht, durch Restriktion aus dem Vektor pCVHPT (Fritze, 1992) entfernt. Die Hygromycinphosphotransferase (HPT)- und promotorlose NPTII-Kassette (HN<sup>-</sup>) wurde daraufhin in den Klonierungs-Vektor pUC19 kloniert. Um das promotorlose NPTII-Gen in das Tabak-Genom zu integrieren, wurde der Vektor zur Transformation von Protoplasten mit PEG verwendet. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte durch Selektion in einem Hygromycin-haltigem Medium (15 mg l<sup>-1</sup>).

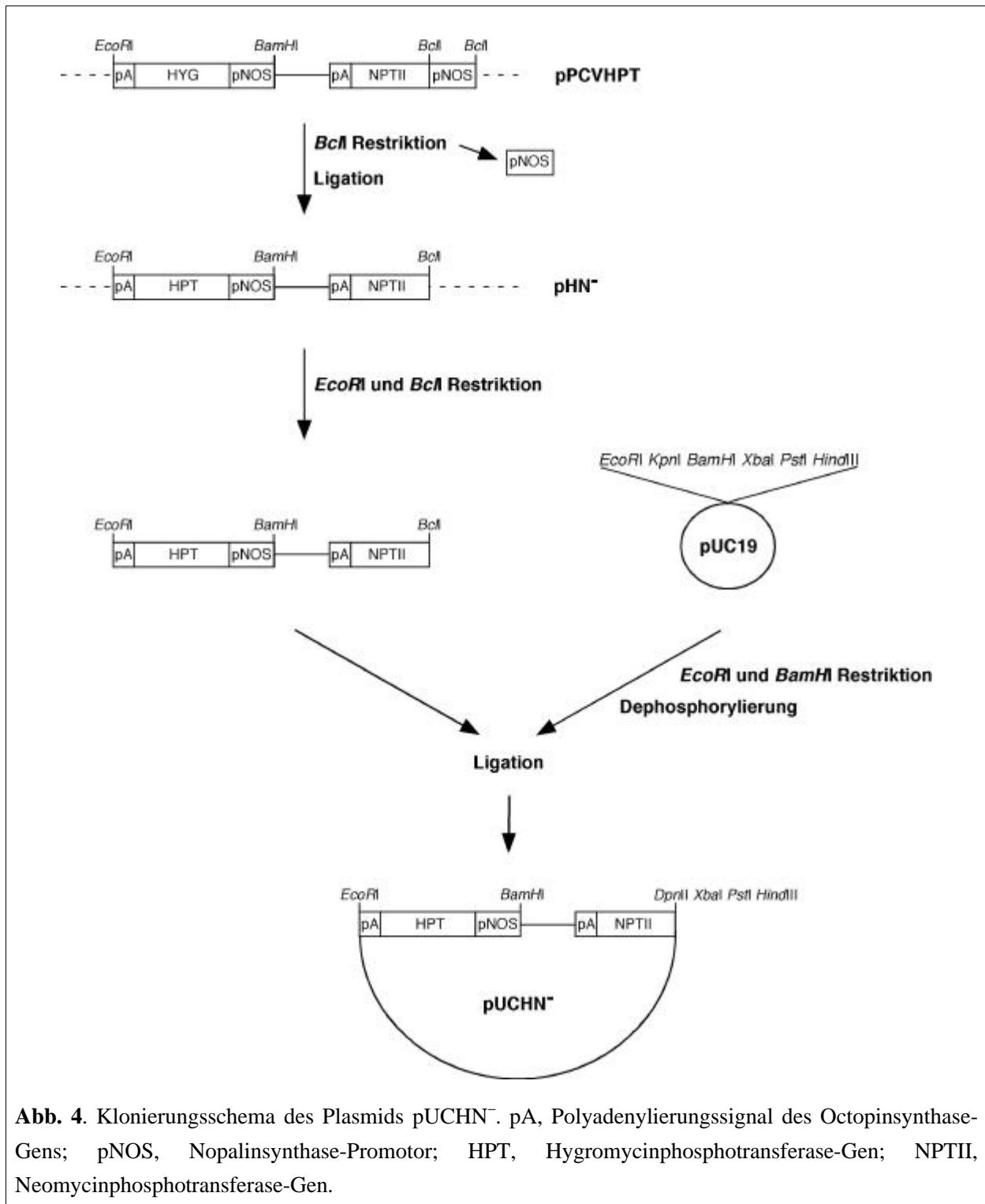
### 3.7. PEG-Transformation des Vektors pUCHN<sup>-</sup> in SR1-Mesophyll-Protoplasten

pUCHN<sup>-</sup>-DNA wurde mit Hilfe des ENDOFREE Plasmid Mega Kits (QIAGEN, Hilden) isoliert und auf eine Konzentration von 1 µg µl<sup>-1</sup> in wässriger Lösung eingestellt. Die sterile DNA wurde für die Transformation von 2×10<sup>7</sup> SR1-Mesophyll-Protoplasten durch PEG verwendet. Die Selektion transformierter Pflanzen erfolgte auf Hygromycin-haltigem Medium (15 µg µl<sup>-1</sup>). Es konnten unter diesen Bedingungen zehn Pflanzen regeneriert werden.

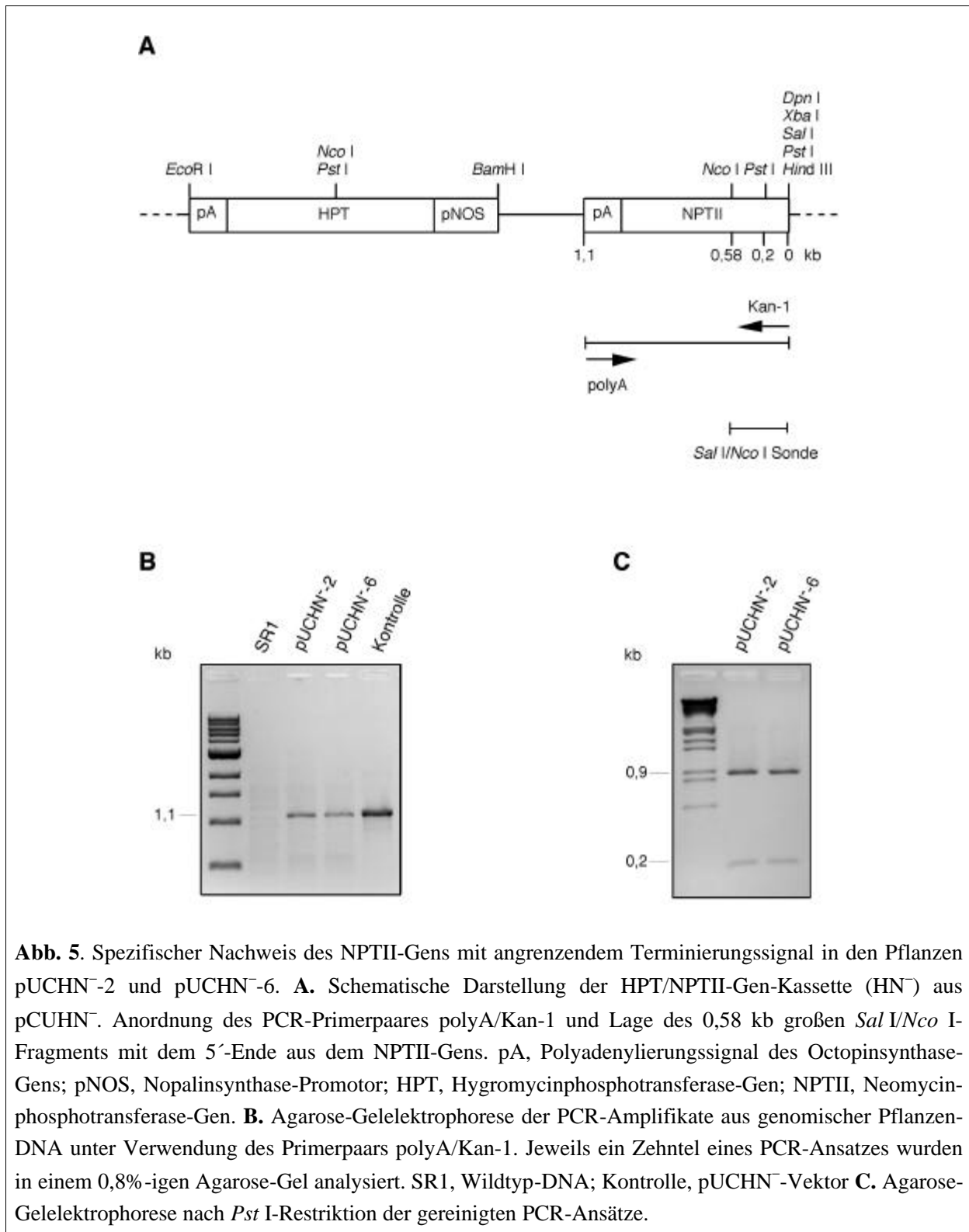
### 3.8. Molekularbiologische Analyse der pUCHN<sup>-</sup>-Pflanzen

Aus den zehn regenerierten Hygromycin-resistenten Pflanzen (Kapitel 3.7.) wurde mit dem DNEASY PLANT Mini Kit (QIAGEN, Hilden) genomische DNA isoliert. Diese DNA wurde durch PCR-Amplifikation auf die Anwesenheit des NPTII-Gens und die Terminationssequenz (pA) überprüft. Dazu wurde das Primerpaar polyA und Kan-1 verwendet (Abb. 5A). Aus der DNA von zwei Pflanzen war es möglich, Fragmente entsprechender Größe von 1,1 kb zu amplifizieren (Abb. 5B). Um die Spezifität der erhaltenen PCR-Banden zu überprüfen, wurde die synthetisierte DNA gereinigt und mit dem Restriktionsenzym *Pst* I verdaut. Das Ergebnis entspricht der theoretischen Erwartung von zwei DNA-Banden der Größe 0,9 und 0,2 kb (Abb. 5A und 5C).

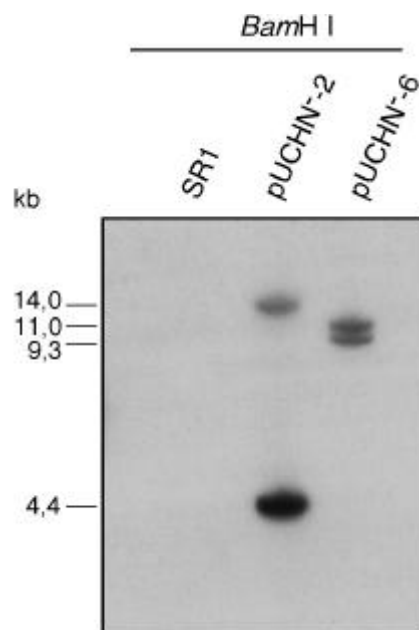




**Abb. 4.** Klonierungsschema des Plasmids pUCHN<sup>-</sup>. pA, Polyadenylierungssignal des Octopinsynthese-Gens; pNOS, Nopalinsynthese-Promotor; HPT, Hygromycinphosphotransferase-Gen; NPTII, Neomycinphosphotransferase-Gen.



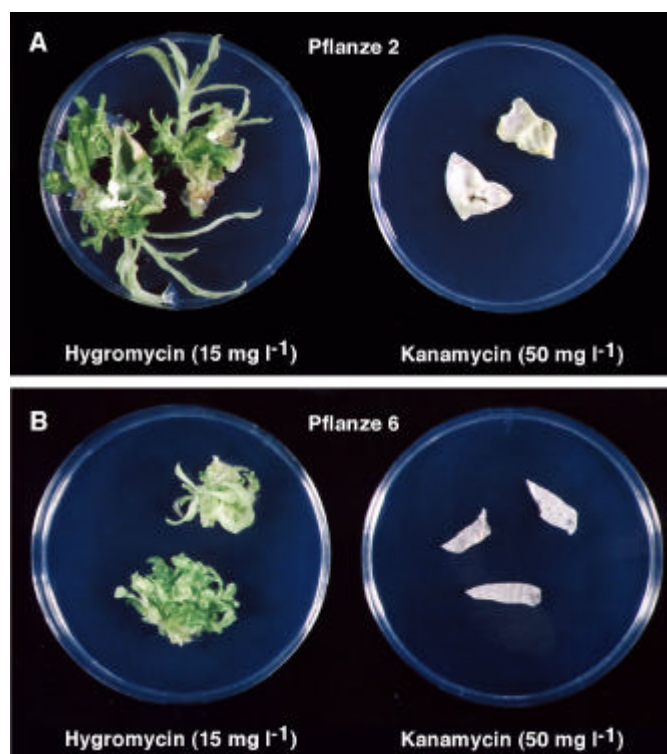
Um Informationen über die Anzahl der integrierten NPTII-DNA-Fragmente in den beiden transgenen Pflanzen zu bekommen, wurde eine „Southern Blot“-Analyse durchgeführt. Die genomische DNA beider Linien wurde mit *Bam*HI geschnitten und auf eine Nylonmembran transferiert. Als Hybridisierungsprobe diente das 0,58 kb große *Sal* I/*Nco* I DNA-Fragment mit dem 5'-Ende des NPTII-Gens (Abb. 5A). Das Enzym *Bam*HI schneidet nicht innerhalb des NPTII-Gens, aber einmal innerhalb des Vektors pUCHN<sup>-</sup>. Deshalb kann aus der Anzahl der hybridisierenden Fragmente lediglich die Anzahl der integrierten NPTII-Sequenzen bestimmt werden. Bei der Transformation mittels PEG integriert die Plasmid-DNA willkürlich ins Pflanzen-Genom; d. h. die Integration kann zufällig an jeder Stelle des Plasmids erfolgen. Aus diesem Grund kann nichts über die Vollständigkeit des Gens mit dazugehöriger Polyadenylierungsstelle ausgesagt werden. Aus der Anzahl der mit der Sonde hybridisierenden Fragmenten kann gefolgert werden, daß in jeder Pflanzenlinie zwei Kopien des NPTII-Gens vorliegen (Abb. 6).



**Abb. 6.** „Southern Blot“-Analyse von genomischer DNA der Pflanzen pUCHN<sup>-</sup>-2 und pUCHN<sup>-</sup>-6. Jeweils 5 µg DNA wurden mit *Bam*H I geschnitten. Als Sonde diente ein 0,58 kb großes <sup>32</sup>P-markiertes *Sal* I/*Nco* I DNA-Fragment mit dem 5'-Ende des NPTII-Gens. Als Negativkontrolle wurde SR1-Wildtyp-DNA verwendet.

### 3.9. Phänotypische Analyse der mit pUCHN<sup>-</sup> transformierten Pflanzen 2 und 6

Zusätzlich zum genetischen Nachweis der gesamten NPTII-Sequenz im Genom der Pflanzen pUCHN<sup>-</sup>-2 und pUCHN<sup>-</sup>-6 mußte gezeigt werden, daß das Gen inaktiv ist und nicht durch endogene Promotoren aktiviert wird. Dazu wurden Blätter beider Pflanzen in ca. 1 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und auf MS3-Medium mit 0,5 µM NAA und 2,2 µM BAP ausgelegt, um die Bildung von Sprossen zu induzieren. Das MS3-Medium wurde zusätzlich entweder mit Hygromycin (15 mg l<sup>-1</sup>) oder Kanamycin (50 mg l<sup>-1</sup>) supplementiert. Blätter von beiden Pflanzen konnten lediglich unter der Selektion von Hygromycin Sprosse entwickeln, nicht aber unter der Selektion von Kanamycin (Abb. 7). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die NPTII-Gene der Pflanzen pUCHN<sup>-</sup>-2 und pUCHN<sup>-</sup>-6 nicht exprimiert werden.



**Abb. 7.** Phänotypischer Nachweis des nicht funktionalen Kanamycin-Resistenz-Gens in den Pflanzen pUCHN<sup>-</sup>-2 und pUCHN<sup>-</sup>-6. Blattstücke wurden auf MS3-Medium mit NAA (0,5 µM) und BAP (2,2 µM) und Hygromycin (15 mg l<sup>-1</sup>) oder Kanamycin (50 mg l<sup>-1</sup>) inkubiert. **A.** Pflanze pUCHN<sup>-</sup>-2 **B.** Pflanze pUCHN<sup>-</sup>-6.

### **3.10. A. tumefaciens Kokultivierung von pUCHN<sup>-</sup>-Mesophyll-Protoplasten**

#### **3.10.1. Beschreibung des zur Mutagenese verwendeten binären Vektors pAC106**

Der in Abb. 2 dargestellte Vektor pAC106 wurde freundlicherweise von Dr. Bernd Reiss, MPIZ Köln, zur Verfügung gestellt. Dieser binäre Vektor kann zur Einschleusung von T-DNA in Pflanzenzellen eingesetzt werden, wenn er mit dem geeigneten Agrobakterienstamm verwendet wird, der die Virulenzfunktionen auf dem Helferplasmid pMP90RK enthält (Koncz und Schell, 1986). Zwischen den beiden Wiederholungssequenzen der T-DNA, genannt „border“ (RB, rechte „border“; LB, linke „border“), ist ein in Pflanzen funktionelles Sulfonamid-Resistenz-Gen (Sundström, 1988) inseriert, welches in transformierten Zellen Resistenz gegen Sulfadiazin vermittelt. Angrenzend an die rechte „border“ enthält die T-DNA des Vektors pAC106 den CaMV 35S-Promotor. Wenn die T-DNA nach erfolgter Transformation in die Nähe eines Pflanzengens integriert, kann dieser virale Promotor die deregulierte Transkription dieses Gens bewirken. Stromaufwärts wurden zusätzlich ein bakterielles Ampicillin-Resistenz-Gen, sowie ein in *E. coli* wirksamer Replikationsursprung aus dem hoch replizierenden Plasmid pUC19 integriert. Diese Anordnung ermöglichte mit Hilfe bestimmter Restriktionsenzyme, z.B. *Bam*H I, *Eco*R I und *Hind* III, die Wiedergewinnung der T-DNA zusammen mit angrenzender Pflanzen-DNA aus zuvor transformierten Pflanzen. Diese DNA kann direkt in *E. coli* transformiert und amplifiziert werden („plasmid rescue“).

#### **3.10.2. Regeneration von Kanamycin-resistenten Mutanten aus transformierten pUCHN<sup>-</sup>-2- und pUCHN<sup>-</sup>-6-Protoplasten**

Zur Transformation durch Kokultivation mit *A. tumefaciens* wurden  $30\text{-}50 \times 10^6$  Zellen der Pflanzen pUCHN<sup>-</sup>-2 und pUCHN<sup>-</sup>-6 eingesetzt. Jede unabhängige Kokultur enthielt  $2 \times 10^6$  Pflanzenzellen. Der *A. tumefaciens*-Stamm GV3101(pMP90RK) wurde für jedes Experiment mit pAC106 transformiert. Eine Stammhaltung von *A. tumefaciens*-Kulturen, die den binären Vektor enthielten, über einen längeren Zeitraum bei 4°C, 16°C oder auch durch regelmäßige Überimpfung bei 28°C, erwies sich als nachteilig. Kokultivationen, die mit solchen älteren Bakterienkulturen durchgeführt wurden, resultierten immer in geringer werdenden Transformationsraten.

Für jedes Experiment wurden drei Transformationskontrollen, wie unter Kapitel 3.5. beschrieben, durchgeführt. Durchschnittlich ergab sich eine Transformationseffizienz von 36% (Tabelle 7).

**Tabelle 7.** Isolierung Kanamycin-resistenter Kalli aus Genmarkierungs-Experimenten mit pAC106. In zehn Experimenten wurden Kulturen von jeweils  $2 \times 10^6$  Protoplasten der Pflanzen pUCHN<sup>-</sup>2 und pUCHN<sup>-</sup>6 zur Transformation eingesetzt. Pro Experiment wurden drei Kulturen als Transformationskontrollen zunächst ohne jegliche Selektion inkubiert um entstehende Mikrokalli vereinzelt auf Sulfadiazin-Selektion ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) weiterzukultivieren. Aus der wachsenden Kallianzahl im Verhältnis zur Gesamtmenge an vereinzelt Kalli wurde die Transformationsrate bestimmt. Außerdem wurde jeweils eine Kultur als Selektions- und Regenerationskontrolle mitgeführt. Kanamycin-resistente, transgene Kalli wurden in Experiment 1-5 durch Doppelselektion mit Sul, Sulfadiazin ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) und Kan, Kanamycin ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) gesucht. In den Experimenten 6-10 wurde ausschließlich mit Kanamycin selektioniert und Kanamycin-resistente ( $K_r$ ) Kalli erzeugt.

Experiment Nr.	Protoplasten-zahl	Transformationsrate (%)	Selektions-Marker	$K_r$ Kalli	pUCHN <sup>-</sup> 2	pUCHN <sup>-</sup> 6
1	$38 \times 10^6$	31	Sul/Kan	-	-	-
2	$50 \times 10^6$	39	Sul/Kan	-	-	-
3	$45 \times 10^6$	42	Sul/Kan	-	-	-
4	$42 \times 10^6$	33	Sul/Kan	-	-	-
5	$30 \times 10^6$	30	Sul/Kan	-	-	-
6	$30 \times 10^6$	30	Kan	-	-	-
7	$40 \times 10^6$	45	Kan	8	6	2
8	$45 \times 10^6$	40	Kan	1	-	1
9	$35 \times 10^6$	35	Kan	1	-	1
10	$30 \times 10^6$	32	Kan	-	-	-

pUCHN<sup>-</sup>2, Ursprungspflanze für die eingesetzten Protoplasten; pUCHN<sup>-</sup>6, Ursprungspflanze für die eingesetzten Protoplasten

Aus fünf Experimenten, die unter der Doppelselektion durch Sulfadiazin ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) und Kanamycin ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) erfolgten, konnten keine transgenen Kalli isoliert werden (Tabelle 7). Unter der Annahme durch die Verwendung beider Antibiotika eine zu starke Streßsituation auf die Tabak-Zellen auszuüben, wurden weitere fünf Experimente unter alleiniger Selektion mit Kanamycin ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) durchgeführt. Insgesamt konnten aus drei dieser Experimente zehn Kanamycin-resistente Kalli isoliert werden (Tabelle 7).

Alle zehn Kanamycin-resistenten Kalli wurden nach Erreichen eines Durchmessers von etwa 3 mm aus dem Gewebeverband isoliert und zum weiteren Wachstum auf MS3-Medium supplementiert mit Kanamycin ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) kultiviert. Von den Kalli wurden Sprosse isoliert und zur Wurzelbildung in MS1-Medium mit Kanamycin ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) und Sulfadiazin ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) überführt. Größere Kalli wurden teilweise auf MS3-Medium ( $0,5 \text{ } \mu\text{M}$  NAA,  $2,2 \text{ } \mu\text{M}$  BAP) mit Kanamycin und Sulfadiazin transferiert und teilweise zur Isolierung von genomischer DNA verwendet.

Die DNA-Präparationen konnten durch PCR-Analyse unter Verwendung der Primerpaare Sul-1 und Sul-2, sowie 35S-1 und 35S-2 (Abb. 2B) auf das Vorhandensein der T-DNA getestet werden. In sechs DNA's war weder die Sulfonamid-Resistenz noch der Promotor zu detektieren. Dieses Ergebnis stimmte mit dem Befund überein, daß diese Pflanzen nicht auf Sulfadiazin-haltigem Medium wuchsen. In vier der untersuchten DNA's konnte sowohl das Sulfadiazin-Resistenz-Gen, wie auch der 35S-Promotor nachgewiesen werden. Die Pflanzen aus denen diese DNA's isoliert worden sind, wuchsen auf Sulfadiazin- und Kanamycin-haltigem Medium und wurden deshalb für die weiteren Untersuchungen verwendet. In Tabelle 8 sind diese Kalli mit ihrer entsprechenden Bezeichnung und Kulturherkunft aufgeführt.

### 3.11. Analyse der T-DNA markierten Linien

Zur weiteren Analyse der Kanamycin- und Sulfadiazin-resistenten Kalli wurde die T-DNA zusammen mit der flankierenden Pflanzen-DNA durch sogenannten „plasmid rescue“ direkt aus genomischen DNA-Präparationen isoliert. Aufgrund der Anordnung der Restriktionsschnittstellen in der DNA der Pflanzen mit promotorlosem Kanamycin-Resistenz-Gen (transgene Pflanzen die das pUCHN<sup>-</sup>-Plasmid enthalten, Abb. 5A) und im für die Genmarkierung eingesetzten Vektor pAC106 (Abb. 2), wurden drei Restriktionsenzyme verwendet: *Hind* III, *Bam*H I und *Eco*R I.

*Hind* III schneidet im Vektor pUCHN<sup>-</sup> unmittelbar vor dem Kanamycin-Resistenz-Gen. Mit Hilfe dieses Enzyms kann ein Teil der pUC19-Sequenz, der stromaufwärts des Markergens liegt, isoliert werden. Alternativ zu *Hind* III könnte allerdings auch *Xba* I eingesetzt werden.

Die *Bam*H I-Schnittstelle im Vektor pUCHN<sup>-</sup> ist zwischen der für Kanamycin- und der für Hygromycin-Resistenz kodierenden Sequenz positioniert. Somit ist durch einen „plasmid rescue“ mit diesem Enzym die Isolierung des NPTII-Gens möglich (Abb. 4 und 5).

**Tabelle 8.** Genmarkierte und nicht genmarkierte Kanamycin-resistente Kalli bzw. regenerierte Pflanzen aus den Transformations-Experimenten.

Herkunft	Bezeichnung	Resistenz
Experiment 7, Pflanze pUCHN <sup>-</sup> -2		
Kultur 1	2.1.1	K <sub>r</sub>
	2.1.2	S <sub>r</sub> /K <sub>r</sub>
	2.1.3	S <sub>r</sub> /K <sub>r</sub>
Kultur 2	2.2.1	S <sub>r</sub> /K <sub>r</sub>
	2.2.2	K <sub>r</sub>
	2.2.3	S <sub>r</sub> /K <sub>r</sub>
Experiment 7, Pflanze pUCHN <sup>-</sup> -6		
Kultur 3	6.3.1	K <sub>r</sub>
	6.3.2	K <sub>r</sub>
Experiment 8, Pflanze pUCHN <sup>-</sup> -6		
Kultur 4	6.4.2	K <sub>r</sub>
Experiment 9, Pflanze pUCHN <sup>-</sup> -6		
Kultur 5	6.5.1	K <sub>r</sub>

Die Isolierung von NPTII ist ebenfalls mit *Eco*R I möglich, wobei in diesem Fall gleichzeitig das HPT-Gen isoliert werden könnte.

Zunächst wurden jeweils 5 µg genomische DNA der Kalli 2.1.2, 2.1.3, 2.2.1 und 2.2.3 mit *Hind* III, *Eco*R I und *Bam*H I geschnitten und die Fragmente in 200 µl Ligationsansatz mit 6 U Ligase 16 Stunden bei 16°C ligiert. Nach Transformation in *E. coli* XL1-blue elektro-kompetenten Zellen und Ampicillin-Selektion wurden Bakterienkolonien, die Plasmid enthalten, identifiziert. Durch PCR-, Restriktions- und Sequenz-Analysen konnte bestätigt werden, daß diese Plasmide zu einem Teil aus der T-DNA mit Replikationsursprung, dem Ampicillin-Resistenz-Gen, sowie 35S-Promotor und flankierender Pflanzen-DNA bestehen.



Die Größen der Plasmide sind in Tabelle 9 angegeben.

**Tabelle 9.** Plasmidgrößen nach dem „plasmid rescue“ der Pflanzen 2.1.2, 2.1.3, 2.2.1 und 2.2.3. Einzelheiten siehe Text.

Pflanze	isoliertes Plasmid	Plasmidgröße (kb)
2.1.2 und 2.1.3	<i>Hind</i> III	3,9
	<i>Bam</i> H I	5,9
	<i>Eco</i> R I	7,7
2.2.1 und 2.2.3	<i>Hind</i> III	3,4
	<i>Bam</i> H I	11,0
	<i>Eco</i> R I	4,0

PCR-Analysen mit dem Primerpaar polyA und Kan-1 zur Identifizierung des NPTII-Gens (Abb. 5A) ergaben lediglich ein positives Ergebnis mit Plasmiden, die durch *Eco*R I- und *Bam*H I-Verdau der genomischen DNA der Pflanzen 2.1.2 und 2.1.3 gewonnen wurden. Restriktions-Analysen und Sequenzierung dieser Plasmide zeigten, daß sie identisch sind. Die Sequenz-Analyse der *Eco*R I- und *Bam*H I-Plasmide zeigt, daß der 35S-Promotor, der kurz vor der rechten „border“ Sequenz der T-DNA lokalisiert ist, 0,9 kb stromaufwärts des NPTII-Startcodons ins pflanzliche Genom integriert wurde (Abb. 8). Die beiden Kalli und die daraus regenerierten Pflanzen 2.1.2 und 2.1.3, die auch ursprünglich aus einer Kultur eines Genmarkierungs-Experimentes stammten, sind demnach Klone und werden im Folgenden als 2K<sub>r</sub> bezeichnet.

Auch die Restriktions- und Sequenz-Daten der Plasmide, die mittels *Hind* III, *Eco*R I und *Bam*H I aus der DNA der Kalli 2.2.1 und 2.2.3 gewonnen wurden, zeigten, daß es sich um identische Klone handelt. Diese Konstrukte enthielten kein NPTII-Gen. Daraufhin wurden verschiedene PCR-Analysen mit der genomischen DNA von Kallus 2.2.1 und dem Primerpaar 35S-1 und Kan-2, durchgeführt. 35S-1 bindet an das 5'-Ende des 35S-Promotors; Kan-2 bindet an das 3'-Ende des NPTII-Gens. Eine Synthese des DNA-Fragments, welches diese beiden Elemente enthält, ist somit möglich. Mit Hilfe des eingesetzten PCR-Systems *TaqPlus*® *Long* (STRATAGENE, Heidelberg) sind Synthesen von Zielsequenzen von bis zu 35 kb möglich. Dabei wurden verschiedene Parameter nach den Angaben des Herstellers variiert. Sämtliche

Experimente verliefen ohne Erfolg. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA von 2K<sub>r</sub> verwendet, aus denen spezifische DNA-Banden synthetisiert werden konnten.

### 3.11.1. „Southern Blot“-Analysen der positiven 2K<sub>r</sub>-DNA

Um Informationen über die Anzahl integrierter T-DNA-Fragmente in das Genom von 2K<sub>r</sub> zu erhalten, wurden jeweils 10 µg 2K<sub>r</sub>-DNA mit *EcoR* I oder *BamH* I verdaut und auf Nylonfilter transferiert. Als Hybridisierungsprobe diente zunächst das 0,84 kb große Sulfadiazin-Resistenz-Gen. Als Matrize zur Herstellung der Sonde wurde ein mittels PCR synthetisiertes DNA Fragment des Sulfadiazin-Resistenz-Gens verwendet. Nach der ersten Autoradiografie wurde die Sonde durch stringentes Waschen entfernt und der Filter mit dem 0,4 kb großen p35S-Fragment rehybridisiert. Die p35S-Matrizen-DNA stammte ebenfalls aus einer PCR-Synthese. In beiden Restriktionsansätzen hybridisieren jeweils zwei Fragmente mit der p35S-Sonde (Abb. 9B), aber jeweils nur ein Fragment mit der Sulfonamid-Resistenz-Sonde (Abb. 9A). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß im 2K<sub>r</sub>-Genom nur eine T-DNA Kopie integriert ist.

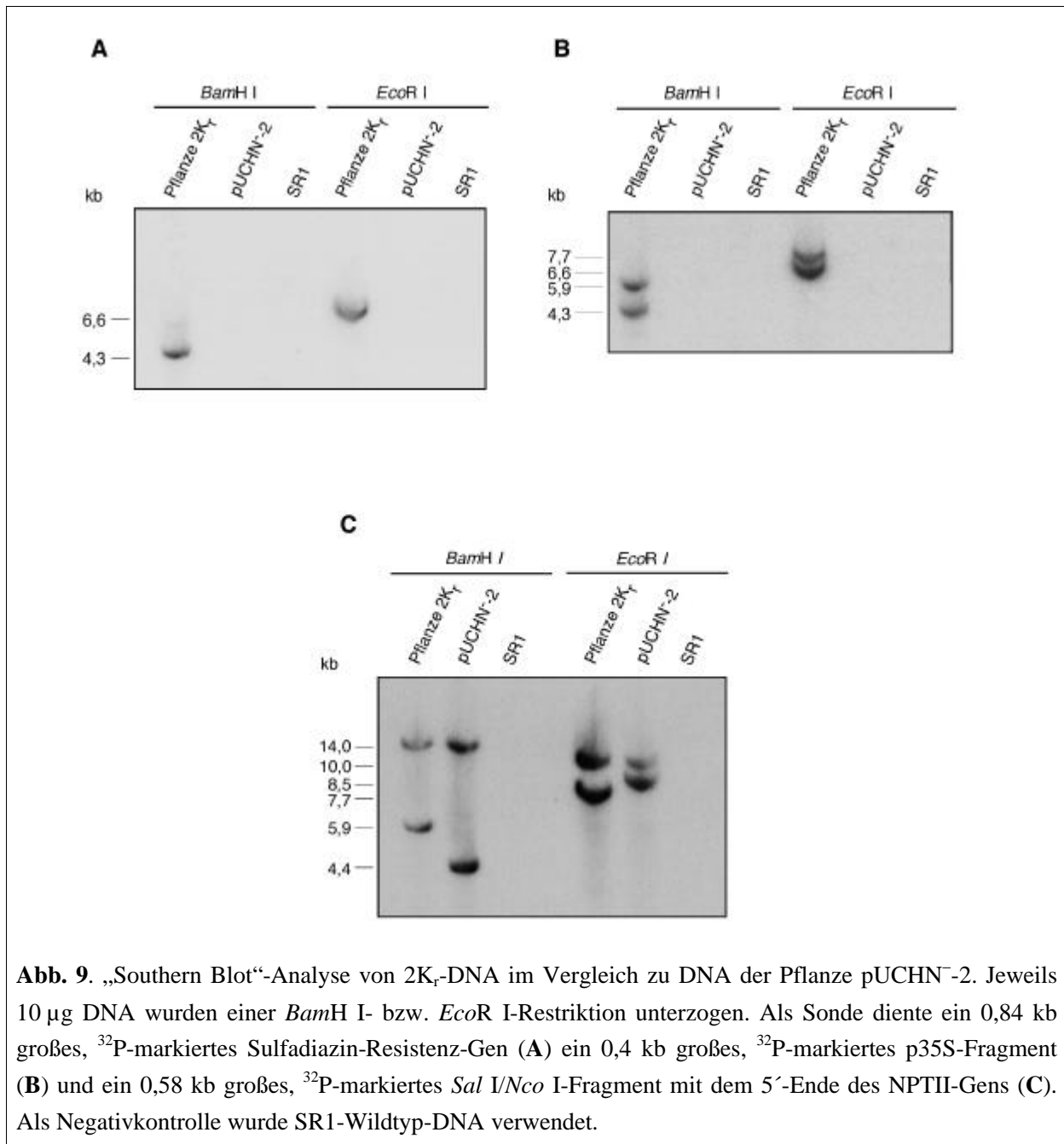
Da die Ursprungspflanze pUCHN<sup>-</sup>2 zwei Kopien des NPTII-Gens enthält (Abb. 6), wurde das Hybridisierungsmuster dieser Pflanze mit dem von 2K<sub>r</sub> verglichen. Bei Hybridisierung mit dem 0,58 kb *Sal* I/*Nco* I DNA-Fragment (5'-Ende des NPTII-Gens) wurde gezeigt, daß nur eines dieser NPTII-Gene durch die Integration der T-DNA markiert wurde (Abb. 9C). In den mit Hilfe von *BamH* I fragmentierten DNA's aus der Pflanze 2K<sub>r</sub> und pUCHN<sup>-</sup>2 hybridisierten jeweils 14 kb große Fragmente mit der *Sal* I/*Nco* I-Sonde. Dies zeigt, daß ein NPTII-Gen nicht T-DNA-markiert ist. Das 4,4 kb große Fragment, in dem das zweite NPTII-Gen in der Pflanze pUCHN<sup>-</sup>2 detektiert wurde, trat hingegen in 2K<sub>r</sub> als nicht radioaktiv markiertes Fragment auf. Statt dessen hybridisierte ein 5,9 kb großes Fragment mit der NPTII spezifischen Sonde. Diese Größenverschiebung resultiert aus der T-DNA Integration in die Nähe des Kanamycin-Resistenz-Gens. In den mit Hilfe von *EcoR* I fragmentierten DNA's der beiden Pflanzen trat ein ähnlich verändertes Hybridisierungsmuster auf. Hier wurde ebenfalls jeweils ein 10 kb großes Fragment aus den verschiedenen Verdauungen identifiziert. Das 8,5 kb Fragment aus der Pflanze pUCHN<sup>-</sup>2 wurde nicht in 2K<sub>r</sub> detektiert, sondern es erschien ein radioaktives Signal der Größe von 7,7 kb.

```

1      NCCTTTTAAN ACGTCGTAAG GGATGACGCA CAATCCCCTA TCCTTCGCAA
      TATA-Box des p35S
51     GACCCTTCCT CTATATAAGG AAGTTCATTT CATTGGAGA GGACAGGGTA
101    CCCGGGGATC AGATTGTCGT TTCCCGCCTT CGGTTTAAAC TATCAGTGTT
RB -> Pflanzen-DNA-Sequenz
151    TAAACCCATA ACACTTATTC ACATGTAACC CATTTTTCTT TGACTTTTAA
201    AGTACTAAGG TTCCTTTTTCG TTTGGGACAT AAAATATTGA GCGCAAGTAT
251    CAACTTAATT AAGAAAAATC TTTTCAGAAT TATATATTAT TTAGGGGTTG
301    AGAAAATCGA ATATGTAATG GAATAGGTCA AAAGCTCATC CAAGATTTTA
351    AAAAAAGTGT TAGATTAAGA CTTTAACTT TGACATTCGG ATTATTTTCC
401    TACAATGAAA TGTTACAAGT CATAAATCCG TACATAATAA TTCAACCTGG
451    TTTGTACCTT ATGCTTTTTTA ATTAATTCCT AGATTCTCTC CAATTGCTCC
501    CCCAACGTGG GAATACTTCA AATGAATGGC GGNTTTGTGA TAATAACT
551    AACTAAAAAT TGGTGCATTT AGGTGATGGG GGAGCTAGAG TATGGAAAAC
601    GGGCTCAGTT TAATCCAGTA ACTTTAGNTC GATCTTTTTA TTTGNTTTAA
651    AAATTCATTG AATATGTATA AATTATTAAT TTACAACCTA GTAACGGGAG
701    ANTAAAATCC TGAACCTCGTA AGCTTGAAAT TCTGGCTCCG CTTTTATAGG
751    NGACGGGCAT GAAANGAATA TCATAAAATG ATTGAGTTTG TTATAAAATA
801    AAGACTATAA AGCAAAGACA AGTATAGATA GAAACTGATA TATTATTCGA
      -> pUCHN--Plasmid-Sequenz
851    ATGCCGGGCC TCTTCGCTAT TACGCCAGCT GCGAAAGGG GGATGTGCTG
901    CAAGGCGATT AAGTTGGGTA ACGCCAGGGT TTTCCAGTC ACGACGTTGT
951    AAAACGACGG CCAGTGCCAA GCTTGCATGC CTGCAGGTCG ACTCTAGAGG
      -> NPTII-Gen
1001   ATCATGTGGA TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCTC CGGCCGCTTG
1051   GGTGGAGAGG CTATTCGGCT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT
1101   CTGATGCCGC CGTGTTCGG CTGTCAGCGC AGGGGCGCCC GGTTCTTTT
1151   GTC AAGACCG ACCTGTCCGG TCCCTGAAT GAACTGCAGG ACGAGGCAGC
1201   GCGGCTATCG TGGCTGGCCA CGACGGGCGT TCCTTGCGCA GCTGTGCTCG
1251   ACGTTGTCAC TGAAGCGGGA AGGACTGGC TGCTATTGGG CGAAGTGCCG
1301   GGGCAGGATC TCCTGTCATC TCACCTTGCT CCTGCCGAGA AAGTATCCAT
1351   CATGGCTGAT GCAATGCGGC GGCTGCATAC GCTTGATCCG GCTACCTGCC
1401   CATTCGACCA CCAAGCGAAA CATNGCATCG AGCGAGCACG TACTCGGATG
1451   GAACCCGTCT TTGTGATCA NGATGATCTG GACNAAGAGC ATNAGGGGCT
1501   CGCGCCAGCC GAACTGTTCC CCAGGCTCAA GCGCGCATG CCCGACGGCG
1551   AGGATCTCNT CNTGACCCAT GCGATGCCT GCTTGCCGAA TATCATGGTG
1601   GAAAATGGCC GCTTTTCTGG ATTCATCGAC TGTGGCCGGC TGGGTGTGGC
1651   GGACCGCTAT CAGGACATAN CGTNGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC
1701   TNGGNGGCGA ATGGGCTGAC CGTTCTCTCN TGCTTTACGG NATCGCCGCT
1751   CCCGATTCNC AGNGCATCGC CTTCTATCGC CTTNTTGACG AGTTCTTCTG
1801   AGCGGGACTC TGGGGTTCGA AATGACCGAC CAAGCGACGC CCAACCTGCC

```

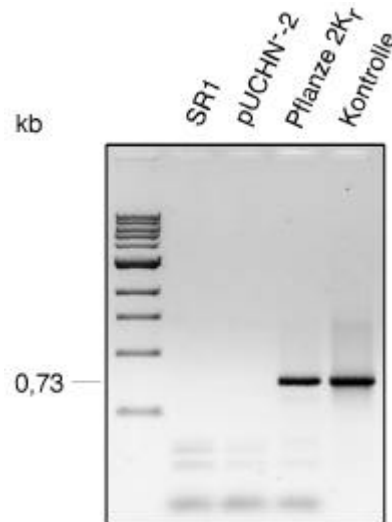
**Abb. 8.** Teilsequenz der reisolierten DNA aus Pflanze 2K<sub>r</sub>. Der 35S-Promotor Primer (35St) ermöglichte die Sequenzierung des T-DNA Endes ausgehend vom 3'-Ende des 35S-Promotors übergehend in flankierende Pflanzen-DNA-Bereiche. Weitere Sequenzierungen wurden mit den Primern 7-1, 7-2, 7-3, 7-4 und 7-5 durchgeführt. RB, rechte „border“.



### 3.11.2. Expressionsanalyse des NPTII-Gens in 2K<sub>r</sub>

Um das Wachstumsverhalten der genmarkierten Kalli und Pflanzen 2K<sub>r</sub> auf Kanamycin-Selektion mit der Expression des Neomycinphosphotransferase-Gens zu korrelieren, wurde eine RNA-Analyse mittels RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde die NPTII-Sequenz spezifisch aus

Gesamt-RNA amplifiziert (Abb. 10). Um Kontaminationen der RT-PCR-Ansätze mit Plasmid-DNA auszuschließen, wurde für jede Reaktion parallel ein Kontrollansatz ohne Zusatz von Reverser Transkriptase getestet. Diese waren in allen Fällen negativ (Ergebnisse nicht gezeigt).

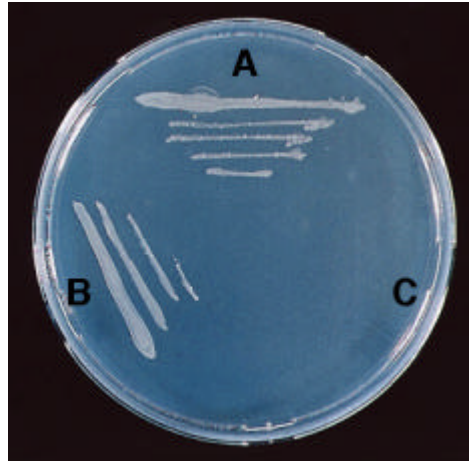


**Abb. 10.** Spezifischer Nachweis des NPTII-Gens in der Pflanze 2K<sub>r</sub> durch RT-PCR. Die reverse Transkription wurde jeweils mit 100 ng Gesamt-RNA und Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primern durchgeführt. Je 1% der einzelsträngigen DNA's wurde nach Zusatz des Primerpaars RT-NPTI und RT-NPTII in 30 PCR-Zyklen amplifiziert. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit pUCHN<sup>-</sup>-Plasmid (Kontrolle). Als Negativkontrollen wurde RNA von SR1-Wildtyp-Pflanzen und RNA von pUCHN<sup>-</sup>-2-Pflanzen verwendet. Ein Zehntel der PCR-Ansätze pflanzlichen Ursprungs und 4% des Kontrollansatzes mit dem pUCHN<sup>-</sup>-Plasmid wurden im 1%-igen Agarosegel analysiert.

### 3.12. Funktionsanalyse des isolierten *BamH* I-Plasmids aus 2K<sub>r</sub> in *E. coli*

Die funktionelle Analyse des *BamH* I-Plasmid, welches aus der Pflanze 2K<sub>r</sub> isoliert wurde, konnte in *E. coli*-Zellen durchgeführt werden. Der 35S-Promotor führt auch in *E. coli* zur Expression von Genen (Assaad und Signer, 1990). Deshalb wurden *E. coli*-Zellen mit dem *BamH* I-Plasmid transformiert und diese auf LB-Medium in Anwesenheit von Kanamycin (50 mg l<sup>-1</sup>) selektioniert. Aus einer so erzeugten Einzelkolonie wurde eine Flüssigkultur angeimpft, die erneut auf LB-Medium mit dem Zusatz von Kanamycin (50 mg l<sup>-1</sup>) kultiviert wurde (Abb. 11) und gleichzeitig zur Plasmid-DNA-Isolation diente. So wurde gezeigt, daß Bakterien, die im Besitz des *BamH* I-Plasmids sind, Kanamycin-resistent sind. Als Nachweis für die

Existenz des Plasmids in den Bakterien wurde die isolierte Plasmid-DNA in einer Restriktions-Analyse positiv getestet.



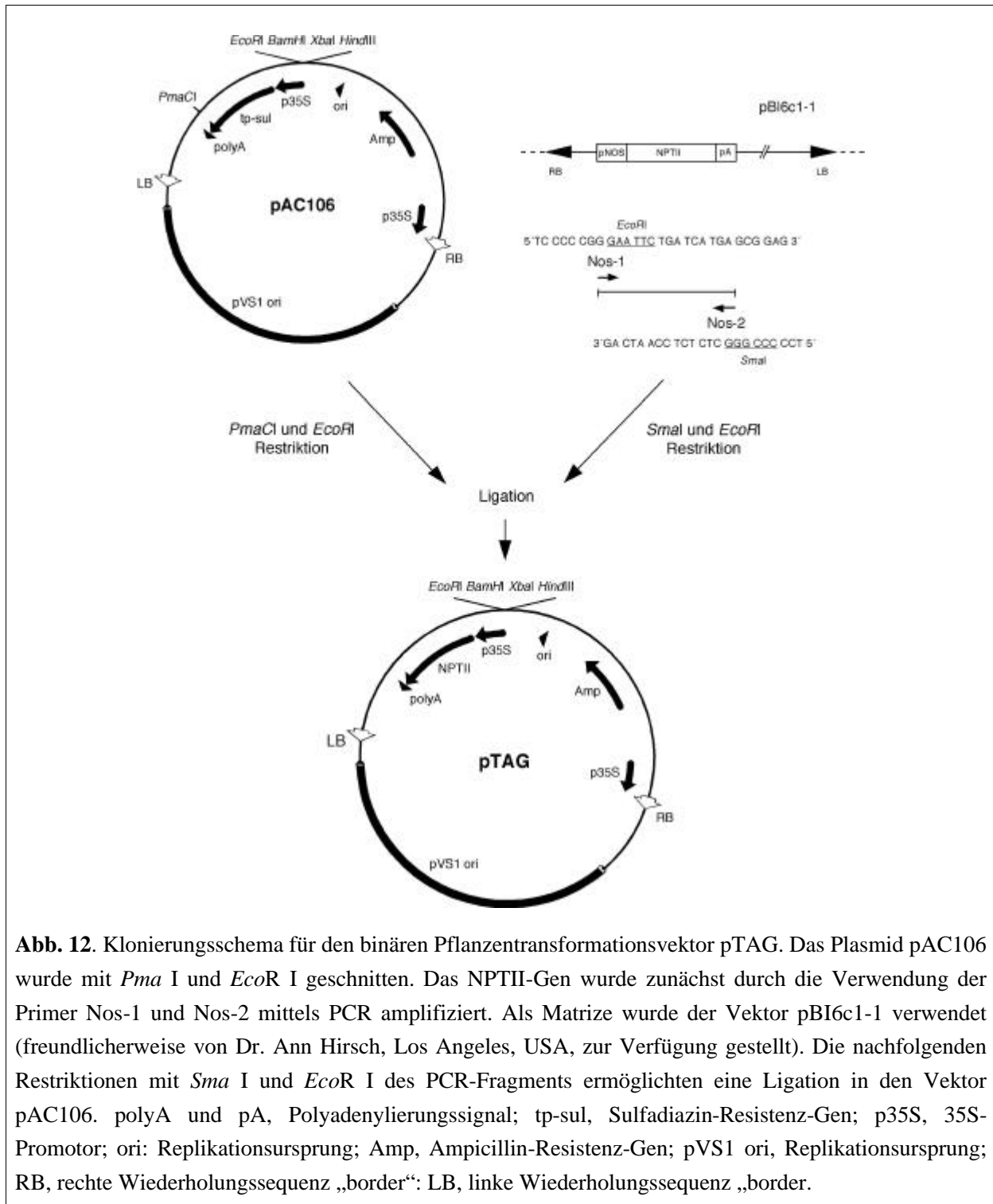
**Abb. 11.** Funktionale Analyse des *Bam*H I-Plasmids aus der Pflanze 2K<sub>r</sub>. Das aus der Pflanze 2K<sub>r</sub> isolierte *Bam*H I-Plasmid wurde in *E. coli*-Zellen transformiert und diese auf LB-Medium in Anwesenheit von Kanamycin (50 mg l<sup>-1</sup>) selektiert. (B). Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pBI6c1-1 (Fang und Hirsch, 1998) (A), als Negativkontrolle das Plasmid pUCHN<sup>-</sup> (C) verwendet.

### 3.13. Klonierung eines neuen binären Vektors pTAG für Genmarkierungs-Experimente mit Tabak-Mesophyll-Protoplasten

Sulfadiazin stellt eine sehr stringente Selektion im Tabak-Protoplasten-Transformations-System dar. Die Verwendung des Vektors pK2L610 (freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Dr. Ann Depicker, Gent), der transformierten Zellen Kanamycin-Resistenz vermittelt, ergab deutlich höhere Transformationseffizienzen von durchschnittlich 40-45% (Daten nicht gezeigt).

Zudem wurde von Weigel *et al.* (2000) über hohe Rekombinationsraten in *A. tumefaciens* bezüglich des Vorkommens identischer Sequenzen innerhalb eines Vektors berichtet. Dieser Sachverhalt trifft auch auf den in obigen Experimenten verwendeten Vektor pAC106 zu, da dieser zwei 35S-Promotoren enthält (Abb. 2). Außerdem besteht zusätzlich die Gefahr der homologen Rekombination bei der Integration der T-DNA ins pflanzliche Genom.

Daher wurde ein neuer Transformationsvektor konstruiert, genannt pTAG, der für weitere „tagging“-Experimente benutzt werden sollte. Eine schematische Darstellung in Abb. 12



verdeutlicht die Klonierungsstrategie. Die T-DNA des binären Vektors pTAG enthält ein durch den Nopalinsynthase-Promotor (pNOS) getriebenes Kanamycin-Resistenz-Gen. Angrenzend an die rechte „border“ der T-DNA befindet sich ein CaMV 35S-Promotor, der nach erfolgter Fusion mit einem Pflanzengen dessen Transkription konstitutiv induzieren sollte. Stromaufwärts dazu ist ein bakterielles Ampicillin-Resistenz-Gen, sowie ein in *E. coli* wirksamer Replikationsursprung integriert. Durch die Verwendung von *EcoR* I, *BamH* I, *Xba* I und *Hind* III ist es möglich, ein an die T-DNA gekoppeltes Stück Pflanzen-DNA zu isolieren und in *E. coli* zu klonieren („right border rescue“).



## 4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden aktivierende Genmarkierungs-Experimente durch Kokultivation von *Nicotiana tabacum*-Mesophyll-Protoplasten mit *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt, um ein im pflanzlichen Genom inseriertes, promotorloses und nicht funktionales Markergen zu isolieren. Dieses Gen, das für Neomycinphosphotransferase (NPTII) kodiert, wurde infolge der T-DNA Integration dereguliert exprimiert. Solche sogenannten „T-DNA activation tagging“-Experimente sind bereits beschrieben (Hayashi *et al.*, 1992, Harling *et al.*, 1997, Miklashevichs *et al.*, 1997), jedoch erwiesen sich diese wissenschaftliche Erkenntnisse als nicht reproduzierbar (Schell *et al.*, 1999).

Die vorliegende Arbeit beabsichtigte die Funktionalität des „T-DNA activation tagging“ im Tabak-Protoplasten-System zu zeigen. Es wurde ein T-DNA-Vektor verwendet, der an der rechten Wiederholungssequenz („border“) mit einem CaMV 35S-Promotor ausgestattet ist. Nach Transformation transgener Mesophyll-Protoplasten, welche das promotorlose NPTII-Gen enthalten, war es durch Selektion auf Kanamycin möglich, eine genmarkierte Pflanze zu erzeugen. In dieser Pflanze war das zuvor inaktive NPTII-Gen durch den 35S-Promotor induziert worden.

### 4.1. Optimierung des Regenerationssystems für Tabak-Mesophyll-Protoplasten

Die von Schell *et al.* (1999) beschriebene Methode zur Bestimmung der Teilungsrate von Tabak-Mesophyll-Protoplasten basiert auf der Inkorporation von [<sup>3</sup>H] Thymidin in die DNA sich teilender Zellen und ermöglicht eine zuverlässige Optimierung der Tabak-Protoplastenkultur in Flüssig-Medium. Die Verwendung verschiedener Medien und Phytohormon-Konzentrationen zur Kultivierung von Tabak-Protoplasten wurde bereits beschrieben (Potrykus und Shillito, 1986; Takebe und Nagata, 1984; de Buck *et al.*, 1998; Dovzhenko *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit sollte ein möglichst effektives System für das „T-DNA activation tagging“ in Tabak-Mesophyll-Protoplasten etabliert werden, das gleichzeitig übersichtlich, einfach in der Handhabung und zeitsparend sein sollte. Damit sollte es einer Person ermöglicht werden, Experimente mit hoher Anzahl von Tabak-Mesophyll-Protoplasten durchzuführen. Zunächst wurden die hierfür optimalen Phytohormon-Konzentrationen im Medium überprüft.

Dovzhenko *et al.*, (1998) zeigten eine sehr schnelle und effiziente Teilungs- und Regenerationsfähigkeit von Tabak-Gewebekulturzellen unter Verwendung von BAP (4  $\mu\text{M}$ ) und NAA (0,5  $\mu\text{M}$ ) im klassischen Verhältnis der Sproßinduktion. Wie aus den Ergebnissen der [ $^3\text{H}$ ] Thymidin-Assays (Abb. 1) hervorgeht, liegen die Zellteilungsraten in Abhängigkeit der Auxin-Konzentration innerhalb der ersten sechs Kulturtage in einem optimalen Bereich zwischen 0,5 und 10  $\mu\text{M}$  NAA. Bei Verwendung von BAP wurden die höchsten Zellteilungsfrequenzen bei 0,5 bis 20  $\mu\text{M}$  dieses Cytokinins festgestellt. Tabelle 3 zeigt, daß höhere Cytokinin- und auch höhere Auxin-Konzentrationen sich im weiteren Verlauf der Gewebekultur negativ auswirken. In Bezug auf hohe NAA-Konzentrationen im späteren Stadium der Regeneration wurde diese Beobachtung bereits beschrieben (Depicker *et al.*, 1985). Für die Genmarkierungs-Experimente wurden deshalb die Kulturmedien von der Protoplasten-Isolation bis zur Abtrennung von Sprossen mit 0,5  $\mu\text{M}$  NAA und 2,2  $\mu\text{M}$  BAP supplementiert. Da die Entwicklung von Sprossen auf diesen Medien spontan einsetzte, entfiel der Transfer von Kallusgewebe auf ein weiteres Medium zwecks Sproßinduktion.

Als bestes Flüssig-Medium in der frühen Phase der Protoplastenkultur erwies sich ein Mannitol-MS-Medium (MS-Medium mit 0,03 M Saccharose + 0,6 M Mannitol, Tabelle 2). Diese Kohlehydratzusammensetzung berücksichtigt die Tatsache, daß sich insbesondere Saccharose reprimierend auf den Protoplasten-Metabolismus auswirkt (Sheen, 1990; Jang und Sheen, 1994). Dieses resultiert in einem langsameren Wachstum in Medien mit höheren Saccharose-Gehalten. Allerdings zeigte sich während der weiteren Inkubation und Einbettung der Zellen in diesem Saccharose-Mannitol-Medium eine sehr geringe Regeneration von Kalli und auch von Sprößlingen (Tabelle 4). Die mit Abstand schnellste und zahlreichste Regeneration von Kalli und Sproßen war mit MS 0,4 M in Flüssigkultur zu beobachten, wie auch zur weiteren Inkubation der fixierten Protoplasten beim Einbetten in Kombination mit MS3-Fest-Medium. MS3-Fest-Medium ist das konventionelle Medium zur Kalluskultivierung bzw. zur Sproßregeneration. Offensichtlich ist MS3-Medium auch das geeignetste Medium zur Kultivierung von in Agarose fixierten Mikrokalli (Tabelle 4). Es wurde daher in dieser Kombination in den Genmarkierungs-Experimenten eingesetzt. Der Anspruch an ein einfaches, aber effizientes Regenerationssystem war mit der Anwendung nur eines Basismediums (MS), supplementiert mit den optimalen

Hormon-Konzentrationen von 0,5  $\mu\text{M}$  NAA und 2,2  $\mu\text{M}$  BAP, erfüllt. Lediglich die Saccharose-Konzentrationen mußten im Verlauf der Experimente verändert werden.

#### **4.2. Herstellung transgener Tabak-Pflanzen mit einem nicht funktionalen Neomycinphosphotransferase-Gen**

Um das „activation T-DNA tagging“-System durch Kokultivation von Tabak-Mesophyll-Protoplasten mit *A. tumefaciens* zu etablieren, wurden mutante Pflanzen hergestellt, in deren Genom ein promotorloses Neomycinphosphotransferase-Gen (NPTII) stabil inseriert war. Die Wahl des promotorlosen Markers fiel auf das Resistenz-Gen für Kanamycin, da dies bei regenerierenden Tabak-Protoplasten als sehr zuverlässig gilt (Herman *et al.*, 1986; André *et al.*, 1986; Gheysen *et al.*, 1990). Die mutanten Pflanzen pUCHN<sup>-</sup>2 und pUCHN<sup>-</sup>6 wurden durch PEG vermittelte DNA-Aufnahme in Tabak-Mesophyll-Protoplasten erzeugt. Diese Methode wurde statt einer *A. tumefaciens*-Transformation gewählt, um das promotorlose NPTII-Gen nicht mit Hilfe einer T-DNA ins Tabak-Genom zu integrieren. Damit sollten weitreichende Sequenzhomologien zur T-DNA des Vektors pAC106 vermieden werden, der in den folgenden aktivierenden Genmarkierungs-Experimenten eingesetzt wurde. Dies beschränkte die Möglichkeit der homologen Rekombination, die ansonsten durch die Verwendung zweier ähnlicher T-DNA's bestanden hätte. Der Nachteil der hier verwendeten stabilen Transformation besteht darin, daß es sich dabei nicht um eine gerichtete DNA-Insertion handelt. Es ist somit nicht eindeutig nachweisbar, ob beide im „Southern Blot“ detektierbaren NPTII-Sequenzen im Genom der Pflanzen pUCHN<sup>-</sup>2 und pUCHN<sup>-</sup>6 vollständig sind (Abb. 6). Mindestens eines dieser Gene ist jedoch in beiden Pflanzen komplett mit angrenzender Terminierungssequenz erhalten. Dies zeigen PCR- und anschließende Restriktions-Analysen (Abb. 5). Da nach Kamalay und Goldberg (1980) 89% der 60.000 Gene des Tabak-Genoms in mehreren Kopien vorliegen, entspricht die Ausgangssituation für ein aktivierendes Genmarkierungs-Experiment selbst mit zwei vollständigen NPTII-Kopien der Wahrscheinlichkeit, mit der auch pflanzliche Gene in einem solchen Experiment isoliert werden könnten.

Die Inaktivität der Neomycinphosphotransferase in den mutanten Pflanzen wurde zweifach nachgewiesen. Die Kultivierung von Blattgewebe der Pflanzen pUCHN<sup>-</sup>2 und pUCHN<sup>-</sup>6 auf

Kanamycin-haltigen Medium (Abb. 7) und die RT-PCR-Analyse von Pflanze pUCHN<sup>-2</sup> (Abb. 10) zeigt, daß das NPTII-Gen nicht exprimiert wird.

### **4.3. Genmarkierung mit einem aktivierenden T-DNA-Vektor und Selektion Kanamycin-resistenter Mutanten**

#### **4.3.1. Transformationsraten bei Kokultivation von Tabak-Mesophyll-Protoplasten mit *A. tumefaciens***

Die Ermittlung der Transformationseffizienz von Tabak-Protoplasten mittels *A. tumefaciens* Kokultivation wurde wie folgt durchgeführt. Da eine genaue Auszählung von in Agarose eingebetteten Mikrokalli auf Grund der Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen ml<sup>-1</sup> nicht möglich war, wurde die prozentuale Regeneration transformierter Kalli zunächst im Gewebeverband abgeschätzt (Abb. 3A). Dies erfolgte durch optischen Vergleich des Wachstums von kokultivierten Zellen, die ohne Selektion regeneriert wurden, mit dem Wachstum von kokultiviertem Gewebe auf dem entsprechenden Antibiotikum. Dies diente vor allem zur Einschätzung des Regenerationsvermögens von transformierten Kalli in direkter Umgebung von sterbenden, nicht transformierten Zellen. Dabei handelte es sich um Kulturbedingungen, wie sie im späteren Genmarkierungs-Experiment eingesetzt wurden. Das transformierte Pflanzenmaterial muß in der Lage sein zu überleben, trotz schädlicher Substanzen (z. B. Phenole), die von sterbenden Zellen ausgeschieden werden. So konnten durchschnittlich 30% transgene Kalli entstehen. Das eingesetzte Selektionssystem erwies sich als sehr erfolgreich, da in 95% der regenerierten Kalli das Vorkommen der T-DNA nachgewiesen wurde (Tabelle 5). Nur wenigen nicht transformierten Zellen wurde das Wachstum scheinbar durch die Nachbarschaft transgener Kalli ermöglicht, die allerdings durch nachträgliches Vereinzeln abstarben und somit schnell erkannt werden konnten (Abb. 3B). Alle dargestellten Ergebnisse beruhen auf Transformationen mit dem Vektor pAC106, der auf die transgenen Pflanzenzellen die Resistenz gegen Sulfadiazin überträgt. In einem späteren Teil dieser Arbeit (Kapitel 4.3.2.) wird erläutert, daß diese Selektion sehr stringent ist. Gleiche Experimente mit einem Vektor, welcher den Mutanten Kanamycin-Resistenz verleiht, ergaben sogar Transformationseffizienzen von 40-45%. Offensichtlich wird die Transformationseffizienz von Pflanzenzellen nicht nur von Kompetenzfaktoren der Pflanzenzellen, spezifischen Eigenschaften der infektiösen Agrobakterien-Stämme oder durch

Wechselwirkungen zwischen Pflanzenzelle und Bakterium bestimmt, sondern auch durch die Toxizität des jeweiligen Selektionsantibiotikums.

Depicker *et al.* (1985) und de Buck *et al.* (1998) beschreiben Transformationsraten von 20-45%, deren Ermittlung allerdings auf der letzteren hier verwendeten Methode basieren. Dazu wurden kokultivierte Zellen zunächst auf nicht-selektivem Medium kultiviert und erst nach erfolgter Kallusregeneration auf Selektionsmedium vereinzelt. Auch in dieser Arbeit konnten auf diese Weise durchschnittlich 45% transgene Organismen regeneriert werden (Tabelle 6).

Gegenüber anderen in der Literatur beschriebenen Kultivierungsmethoden stellt die deutlich schnellere Regeneration von transgenen Pflanzen ein Vorteil des hier entwickelten Regenerations- und Transformationssystems dar. Erste Sprosse konnten schon 21 Tage nach der Protoplasten-Herstellung isoliert werden.

#### **4.3.2. Regeneration von Kanamycin-resistenten Mutanten**

Zunächst begann die Selektion transformierter Zellen mit Sulfadiazin und mit Kanamycin fünf Tage nach dem Einbetten in Agarose, daher zehn Tage nach der Protoplasten-Isolierung. Diese Vorgehensweise führte zum raschen Absterben sämtlicher Kulturen aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Regeneration einzelner resistenter Zellen war auf diese Weise nicht möglich. Eine stringente Doppelselektion mit zwei Antibiotika gleichzeitig, versetzt die Gewebekulturzellen offensichtlich in eine zu starke Streßsituation (Tabelle 7). Deshalb war es den Zellen nicht möglich, trotz Ausbildung der Resistenzen zu überleben. So führte beispielsweise de Buck *et al.* (1998) Kotransformations-Experimente mit zwei verschiedenen T-DNA-Konstrukten und Tabak-Mesophyll-Protoplasten durch, wobei eine der T-DNA's Hygromycin-Resistenz, die andere Kanamycin-Resistenz vermittelte. In dieser Arbeit wurden die entstehenden Mutanten dabei abwechselnd auf dem einen oder dem anderen Antibiotikum selektioniert, jedoch nicht bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Substanzen im Medium.

Die folgenden fünf Genmarkierungs-Experimente wurden daher zunächst in Anwesenheit von Kanamycin durchgeführt, um die regenerierten Kalli danach mit Sulfadiazin auf das Vorhandensein der T-DNA zu überprüfen. Von anfänglich zehn regenerierten Kanamycin-resistenten Kalli stellten sich vier (2.1.2, 2.1.3, 2.2.1 und 2.2.3) als T-DNA-markiert heraus

(Tabelle 8). Unter diesen konnten durch weitere Restriktions- und Sequenz-Analysen jeweils zwei identische Klone identifiziert werden. Bei den übrigen sechs Kanamycin-resistenten Kalli handelt es sich offenbar um falsch-positive, nicht Sulfonamid-resistente Kalli. Dies wurde phänotypisch bestätigt, da das Gewebe auf mit Sulfadiazin versetztem Medium abstarb. Zusätzlich ergaben auch PCR-Analysen mit genomischer DNA weder Hinweise für die Existenz des Sulfonamid-Resistenz-Gens, noch für den 35S-Promotor. Die fehlende Amplifikation des 35S-Promotors räumte gleichzeitig die Möglichkeit des Einbaus einer auf der linken „border“ Seite verkürzten T-DNA aus. Die Integration einer T-DNA, die kein vollständiges Sulfonamid-Resistenz-Gen mehr enthält, jedoch einen intakten 35S-Promotor an der rechten „border“, könnte trotz fehlender Sulfadiazin-Resistenz die Aktivierung des NPTII-Gens induzieren. Auch der zweite, vor dem Sulfadiazin-Resistenz-Gen lokalisierte 35S-Promotor könnte in einem solchen Fall die Aktivierung von Genen im Pflanzen-Genom bewirken.

An dieser Stelle wird die somatoklonale Variation als ein allgemeines Problem der Gewebekultur deutlich. Durch die anfänglich fehlende Selektion zur Überprüfung der Existenz der T-DNA, wurde es den Zellen ermöglicht, ohne den Einfluß des aktivierenden 35S-Promotors der T-DNA auf das NPTII-Gen zu wachsen.

#### **4.4. Molekularbiologische Analyse der Kanamycin-resistenten Pflanzen 2K<sub>r</sub>**

##### **4.4.1. Reisolation der T-DNA aus den markierten Linien 2.1.2 und 2.2.1**

Die direkte Reisolation von T-DNA inklusive flankierender Sequenzen erfolgte als sogenannter „right border plasmid rescue“. Die T-DNA besitzt mehrere Schnittstellen, die in direkter Nachbarschaft zu dem in *Escherichia coli* funktionalen Replikationsursprung, dem bakteriellen Ampicillin-Resistenz-Gen und dem aktivierenden 35S-Promotor angeordnet sind (Abb. 2). Diese können verwendet werden, um den Teil der T-DNA, der unbedingt zur erfolgreichen Reisolation nötig ist, von dem nicht erforderlichen „left border“-Bereich zu trennen. Damit verkürzt sich das zu isolierende chimäre Plasmid aus T-DNA und Pflanzen-DNA um mindestens 2,6 kb, was die Reisolation von sehr großen Fragmenten erleichtert. Die Organisation des Vektors, der das promotorlose NPTII-Gen trägt und im Genom der Pflanzen pUCHN<sup>-</sup>2 und pUCHN<sup>-</sup>6 integriert wurde (Abb. 4 und 5), läßt zunächst zwei sinnvolle Restriktionsstellen zu, um aus den beiden genmarkierten Linien das aktivierte NPTII-Gen zu isolieren: *Bam*H I und *Eco*R I. Die *Bam*H I

Schnittstelle ist zwischen NPTII- und HPT-Gen lokalisiert, *EcoR* I hingegen stromabwärts des HPT-Gens. Das theoretisch kürzeste 35S-Promotor/NPTII-Fragment sollte daher mittels *BamH* I-Verdau erhalten werden. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß eine zusätzliche *BamH* I-Restriktionsstelle stromaufwärts des NPTII-Gens im pflanzlichen Genom lokalisiert ist. Deshalb war auch eine Isolation mittels *EcoR* I-Verdau möglich. Mit Hilfe eines *Hind* III-Verdaus konnte ebenfalls der Hinweis auf die Anwesenheit des pUCHN<sup>-</sup>-Vektors in direkter Nähe des 35S-Promotors erbracht werden, da *Hind* III unmittelbar vor dem Startkodon des NPTII-Gens schneidet.

Genomische DNA's der Pflanzen 2.1.2 und 2.2.1 wurden mit den drei obengenannten Enzymen verdaut, ligiert und in *E. coli* transformiert. Aus den jeweiligen drei Ansätzen der Pflanzen 2.1.2 und 2.2.1 konnten selbstreplizierende Plasmide erfolgreich kloniert werden (Tabelle 9). Sequenz-Analysen der isolierten Plasmide der Pflanze 2.1.2 haben gezeigt, daß sowohl das *BamH* I-, wie auch das *EcoR* I-Plasmid das NPTII-Gen im Abstand von 0,9 kb zum 35S-Promotor besitzen (Abb. 8). Auch das isolierte *Hind* III-Plasmid zeigt die erwartete Struktur, bestehend aus 35S-Promotor, Pflanzen-DNA und einem kurzen Bereich des pUCHN<sup>-</sup>-Vektors stromaufwärts der *Hind* III-Schnittstelle. Diese Pflanze 2.1.2 wurde als 2K<sub>r</sub> bezeichnet. Aus der Pflanze 2.2.1 konnten ebenfalls durch die Verwendung der Enzyme *BamH* I, *EcoR* I und *Hind* III Plasmide isoliert werden. Allerdings konnte bis zu einer Distanz von 6,8 kb entfernt vom 35S-Promotor kein Hinweis auf das Vorhandensein des NPTII-Gens gefunden werden. Weder Restriktions- noch PCR-Analysen deuten auf die Existenz des NPTII-Gens in den isolierten Plasmiden hin. Auch die PCR-Analysen der genomischen 2.2.1-DNA mit dem *TaqPlus*® Long PCR Systems waren ergebnislos (Kapitel 3.11.). Hierdurch konnte ausgeschlossen werden, daß keine T-DNA mit 35S-Promotor in einem Abstand bis zu 35 kb zum NPTII-Gen inseriert hat. Damit scheint auch in diesem Fall die Kanamycin-Resistenz durch somatoklonale Variation im Genom während der Gewebekultur aufgetreten zu sein und keine Folge der Aktivierung durch die T-DNA Integration.

#### 4.4.2. Molekularbiologische Charakterisierung der Pflanze 2K<sub>r</sub>

Die „Southern Blot“-Analysen der genomischen DNA haben gezeigt, daß ein einziges T-DNA-Fragment in das Genom der Pflanze 2K<sub>r</sub> integriert ist (Abb. 9). Durch die *BamH* I- und *EcoR* I-

Restriktion der genomischen DNA war zu erwarten, daß jeweils ein Fragment mit der Sulfadiazin-Resistenz-Sonde hybridisiert (Abb. 9A), mit der Sonde für den 35S-Promotor hingegen jeweils zwei Banden entstehen würden (Abb. 9B). Dabei müssen die Fragmentgrößen der mit der Sulfadiazin-Resistenz-Sonde hybridisierenden DNA mit einer der Banden aus den beiden mit dem 35S-Promotor hybridisierenden Fragmenten übereinstimmen. Das 4,3 kb große *Bam*H I-Fragment und auch das 6,6 kb große *Eco*R I-Fragment, in denen das Sulfonamid-Resistenz-Gen lokalisiert ist, wurde in beiden Hybridisierungs-Experimenten nachgewiesen. Bei den zusätzlichen Banden der Größe 5,9 und 7,7 kb auf dem mit dem 35S-Promotor hybridisierten „blot“ handelt es sich um die *Bam*H I- und *Eco*R I-Plasmid-Fragmente. Auch die Hybridisierung mit der Sonde des 5'-Endes des NPTII-Gens bestätigt die Fragmentgrößen von 5,9 und 7,7 kb (Abb. 9C). Hier wird im Vergleich mit dem Bandenmuster der Pflanze pUCHN<sup>-2</sup> deutlich, daß das ursprünglich 4,4 kb große *Bam*H I-Fragment durch die T-DNA-Markierung vergrößert wird. Das 8,5 kb große *Eco*R I-Plasmid wird dabei auf eine Größe von 7,7 kb reduziert.

Zusätzlich zur Regeneration auf Kanamycin-haltigen Medien wurde die Expression des NPTII-Gens in der intakten Pflanze 2K<sub>r</sub> mittels RT-PCR-Analyse nachgewiesen (Abb. 10).

#### **4.4.3. Funktionaler Nachweis des *Bam*H I-Plasmids aus dem „plasmid rescue“ der Pflanze 2K<sub>r</sub>**

Um zu zeigen, daß die Kanamycin-Resistenz der Pflanze 2K<sub>r</sub> durch das NPTII-Gen auf dem „rescue plasmid“ hervorgerufen wird, wurde das aus Pflanzen isolierte *Bam*H I-Plasmid in *E. coli* transformiert. Assaad und Signer (1990) zeigten die Expression des NPTII-Gens in *E. coli* unter Kontrolle des 35S-Promotors. Somit ist dieser virale Promotor auch in den Bakterien aktiv. Die Bakterienkulturen, die mit dem *Bam*H I-Plasmid transformiert wurden, wuchsen auf Kanamycin-haltigem Medium (Abb. 11). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Resistenz auf das Vorhandensein des Plasmids zurückzuführen ist. Somit wird das NPTII-Gen durch den 35S-Promotor auf dem „tagging“-Vektor induziert.

#### **4.5. Beurteilung des angewendeten Genmarkierungs-Systems**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Methode der aktivierenden T-DNA-Mutagenese in Tabak-Mesophyll-Protoplasten möglich ist. Es wurde ein Mutationsereignis erzeugt, wodurch



die primär transformierten Protoplasten auf den gewünschten Phänotyp selektiert werden konnten. Die entstandenen transformierten Zellen konnten dann erfolgreich zu transgenen Pflanzen regeneriert werden.

#### 4.5.1. Statistische Auswertung

Das Tabak-Genom besteht aus  $1,5 \times 10^9$  Basenpaaren. Bei 60% des Genoms handelt es sich um repetitive Sequenzen, 40% der DNA liegen als Einzelkopie vor (Goldberg, 1978; Pruitt und Meyerowitz, 1986).  $7 \times 10^7$  Nukleotide können transkribiert werden, was einer Anzahl von 60.000 Genen entspricht, von denen 11% singulär vorkommen (Kamalay und Goldberg, 1980). Da T-DNA-Insertionen ins Pflanzengenom vorzugsweise in transkribierte Bereiche erfolgen (Chyi *et al.*, 1986; Koncz *et al.* 1989, Herman *et al.* 1990), wird zur statistischen Auswertung die Anzahl von  $7 \times 10^7$  bp bzw. 60.000 Genen zu Grunde gelegt.

In den Genmarkierungs-Experimenten 6-10 (Tabelle 7) wurden insgesamt  $18 \times 10^7$  Protoplasten eingesetzt, wobei  $5 \times 10^7$  Zellen als Kontrollen verwendet wurden. Insgesamt standen  $13 \times 10^7$  Zellen zur Verfügung, um das NPTII-Gen mittels T-DNA zu markieren und so eine Aktivierung der Kanamycin-Resistenz zu bewirken. Die durchschnittliche Transformationsrate dieser fünf Experimente belief sich auf 36,4%. Wie oben dargestellt, konnte eine positive Pflanze regeneriert werden, die durch Integration des 35S-Promotors in der Nähe des NPTII-Gens einen Kanamycin-resistenten Phänotyp ausprägt. Bei einer angenommenen Regenerationsrate von 20% (Depicker *et al.* 1985) entwickeln sich  $26 \times 10^6$  Kalli aus einer eingesetzten Menge von  $13 \times 10^7$  Protoplasten. Basierend auf der Transformationseffizienz von 36,4%, handelt es sich dann bei  $9,5 \times 10^6$  Kalli um Transformanden. Wilson *et al.* (1996) berichtet von vier dominanten Mutationen unter 1100 mutanten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, die durch ein „activation tagging“ mit einem *Ds*-Element, welches den 35S-Promotor trägt, erzeugt wurden. Weigel *et al.* (2000) fanden während des „T-DNA activation taggings“ unter Verwendung von vier Verstärkerelementen des 35S-Promotors eine dominante Mutation in 1000 transgenen *Arabidopsis*-Linien. Bei einem Vergleich der Transformation von Tabak-Protoplasten und *A. thaliana*-Pflanzen wurden nahezu gleiche Anteile von Promotorfusionen in „promotor tagging“-Experimenten gefunden (Koncz *et al.* 1989). Wird die Wahrscheinlichkeit von vier aus 1100 (0,36%) auf  $9,5 \times 10^6$  transgene Ereignisse angewendet, so ergibt sich die Anzahl von ca. 34.500 dominanten Mutationen in den hier

durchgeführten Genmarkierungs-Experimenten. Bei nur 6600 als Einzelkopie vorliegenden Genen ist daher anzunehmen, daß bei dem Umfang der in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten theoretisch jedes Gen durchschnittlich einmal markiert ist. Somit liegt das Ergebnis von einer markierten, durch den 35S-Promotor aktivierten Kanamycin-resistenten Pflanze genau im erwarteten Bereich. Das Vorhandensein von eventuell zwei vollständigen NPTII-Genen ist statistisch zu vernachlässigen, da der größte Teil der natürlich vorkommenden Genen ebenfalls in mehreren Kopien vorliegt.

Bei der Verwendung von SR1-Protoplasten zu weiteren Genmarkierungs-Experimenten müßten nicht, wie hier beschrieben, fünf Experimente, mit einer Gesamtanzahl von  $18 \times 10^7$  Protoplasten, durchgeführt werden, um statistisch jedes Gen mindestens einmal zu markieren. Auf Grund der effektiveren Protoplasten-Isolation aus SR1-Pflanzen würden zwei Experimente ausreichen; denn eine Person kann ein Experiment eines Umfanges von ca. 60-65 Kulturen, also  $12-13 \times 10^7$  Zellen, leicht bearbeiten. Ferner kann man davon ausgehen, daß an einem bestimmten Signaltransduktionsweg nicht nur ein Gen beteiligt ist. Es dürfte sich dabei vielmehr um mehrere verschiedene Gene handeln, die an einem Transduktionsmechanismus mitwirken. Dies erhöht wiederum die Wahrscheinlichkeit, während eines Experimentes mindestens ein gesuchtes Gen zu markieren.

#### **4.5.2. Vergleich mit anderen „T-DNA activation tagging“-Systemen**

In den letzten Jahren wurden „T-DNA activation tagging“-Experimente vor allem in *Arabidopsis thaliana* beschrieben. Diese unterscheiden sich nicht nur in der Verwendung einer anderen Pflanzenart, sondern auch in der Methode der Transformation und durch den Gebrauch von Transformationsvektoren, die vier CaMV 35S-Verstärkerelemente als Aktivator enthielten. Außerdem beruhte die Identifikation von Mutanten auf einem anderen Selektionssystem. Weigel *et al.* (2000), Huang *et al.* (2001), Ito und Meyerowitz (2000), Borevitz *et al.* (2000) und Kardailsky *et al.* (1999) führten Transformationen durch Besprühen blühender *A. thaliana* Pflanzen mit *A. tumefaciens* mit Hilfe der Vakuum-Infiltrationsmethode durch. Die Samen transformierter Pflanzen wurden geerntet und ausgesät. Die Selektion primärer Transformanden erfolgte auf der Ebene von Setzlingen, die auf die jeweilige auf den Transformationsvektoren lokalisierte Resistenz „gescreent“ wurden. Die Transformationseffizienz lag für diese Methode

bei 2% der geernteten Samen. Neff *et al.* (1999) transformierte *A. thaliana*, indem Blüten in eine *A. tumefaciens* Suspension getaucht wurden. *A. thaliana*-Blätter wurden von van der Graaff *et al.* (2000) transformiert. Die Suche nach gewünschten Mutationen in sämtlichen dieser „T-DNA activation tagging“-Experimenten erfolgte ausschließlich durch die Ausprägung bestimmter Phänotypen, was die Notwendigkeit großer transgener Populationen voraussetzt. Diese Art des „screenings“ ist sehr arbeitsintensiv und erfordert viel Raum im Gewächshaus. Im Vergleich dazu ist die in dieser Arbeit dargestellte Verfahrensweise, wie oben erläutert, leicht von einer einzigen Person durchführbar, platzsparend und kann schnell zu Ergebnissen führen. Der Hauptvorteil dieser Methode ist die direkte Selektion von mutierten Einzelzellen auf die gewünschte phänotypische Ausprägung. Eine ähnliche Vorgehensweise benutzte schon Kakimoto (1996) indem er *A. thaliana* Kalli transformierte und in Abwesenheit von Cytokinin Cytokinin-unabhängige Mutanten regenerierte.

Der Vorteil bei der Verwendung von *A. thaliana* in Genmarkierungs-Experimenten liegt zweifelsfrei darin, daß *Arabidopsis* sich als genetische Modellpflanze etabliert hat (Rédei, 1992). Das Arabidopsis-Genom umfaßt lediglich  $10^8$  Basenpaare und geringe Anteile an repetitiver DNA von 10-14% (Meyerowitz, 1992). Zudem ist die gesamte Genom-Sequenz inzwischen bekannt (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Der Vorteil bei der Verwendung von Tabak-Pflanzen zur Etablierung der in dieser Arbeit beschriebenen „activation T-DNA tagging“-Methode beruht eindeutig auf der Überlegenheit bezüglich der Handhabung des Tabak-Protoplasten-Systems. Die Isolierung und Regeneration einer großen Anzahl von *Arabidopsis*-Mesophyll-Protoplasten ist nicht möglich. Auf Grund der Tatsache, daß das Arabidopsis-Genom bekannt ist, könnten daher leicht Gene im Tabak isoliert und durch Homologievergleiche in *Arabidopsis* identifiziert werden.

Die Verwendung von unterschiedlichen Aktivator-Elementen ist abhängig von den gewünschten Ereignissen. Der hier verwendeten 35S-Promotor bewirkt in allen Pflanzenteilen die konstitutive Expression von Genen (Benfey *et al.*, 1989, Benfey *et al.*, 1990, Tyagi, A. K., 2001). Dabei ist der Promotor über weite Distanzen nicht so wirksam, wie es bei einem Multimer an Verstärkerelementen der Fall ist. Im Vergleich dazu verursachen die in anderen Experimenten benutzten 35S-Verstärkerelemente meist nur eine Erhöhung der endogenen Expression in

spezifischem Gewebe. So konnten beispielsweise viele Gene, die durch Überexpression bestimmte bekannte Phänotypen erzeugen, nicht durch die Aktivierung mittels des Tetramers an 35S-Verstärkerelementen gefunden werden (Weigel *et al.*, 2000). Dies könnte an Faktoren liegen, die Interaktion der Verstärkerelemente mit endogenen Genen verhindern. So gibt es viele Isolatorsequenzen, die Gene vor verstärkenden oder inhibitorischen Sequenzen schützen (Chung *et al.* 1993). Außerdem ist aus anderen Systemen bekannt, daß Verstärkerelemente nur auf geeignete Promotoren aktivierend wirken, da es auch bei Promotoren bestimmte Präferenzen und Selektivität gibt (Ohtsuki *et al.* 1998). Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß konstitutive Deregulation von Genen, hervorgerufen durch den gesamten 35S-Promotor, eventuell nicht mehr die natürliche Aufgabe eines Genproduktes widerspiegelt, scheinen beide Ansätze von Experimenten zur aktivierenden Genmarkierung sinnvoll. Beide Methoden können sich gegenseitig gut ergänzen.

Nicht nur in den beiden oben beschriebenen Pflanzenarten wurden bisher erfolgreich aktivierende Genmarkierungs-Experimente durchgeführt. Van der Fits und Memelink (2000) transformierten Zellsuspensionskulturen von *Catharanthus roseus* mit *A. tumefaciens*, das ein aktivierendes T-DNA Konstrukt enthielt. Zur Identifizierung von Mutanten wendeten sie ebenfalls erfolgreich eine direkte Selektion an. Dabei handelte es sich um die Ausbildung einer Resistenz gegenüber einer hohen Konzentrationen von 4-Methyl-Tryptophan. Dadurch konnte das Enzym Tryptophan-Decarboxylase, welches 4-Methyl-Tryptophan detoxifiziert, als Marker für die deregulierte Expression von Genen im betreffenden Signaltransduktionsweg verwendet werden. Somit sind die Voraussetzungen der Anwendung des „activation T-DNA tagging“-Systems in Zukunft für viele durch *A. tumefaciens* transformierbare Pflanzenarten gegeben.

#### **4.6. Ausblick**

Diese Arbeit zeigt, daß die Methode der Aktivierung von Pflanzengen durch die T-DNA Integration ins Pflanzen-Genom in Tabak-Mesophyll-Protoplasten möglich ist. Das zur Transformation eingesetzte Protoplasten-System wurde entsprechend optimiert. Die statistische Auswertung verdeutlicht, daß diese Methode ein vielversprechender Ansatz zur Isolierung von unbekanntem Genen ist.

Spezifische Mengen der Phytohormone Auxin und Cytokinin bewirken beispielsweise die Teilung von Pflanzenzellen *in vivo* wie auch *in vitro*. In der Protoplasten-Kultur führt die Erniedrigung der Konzentration eines dieser Hormone zu stark vermindertem Wachstum der Zellen. Durch das Fehlen eines Phytohormons in einer solchen Gewebekultur wird die Zellteilung sogar gänzlich unterdrückt. Dies verursacht das Absterben der Protoplasten. Durch das Entfernen von Auxin oder Cytokinin aus der Protoplasten-Kultur sollte es möglich sein, mit Hilfe des in dieser Arbeit dargestellten „tagging“-Systems, Gene aus den Signaltransduktionswegen die zur Zellteilung führen zu isolieren. Das Wachstum von Zellen in Medium mit nur einem Pflanzenhormon kann nur durch Gene hervorgerufen werden, die aufgrund deregulierter Expression die Wirkung der entsprechenden Substanz ersetzen können.

Die Erhöhung von verschiedensten Substanzen in toxische Bereiche führt ebenfalls zum Absterben der Gewebekultur. Durch die Selektion von Zellen auf beispielsweise toxischen Auxin- oder Cytokinin-Mengen können somit Gene, die zu deren Detoxifizierung führen, gefunden werden. Weiterhin bestehen so auch Möglichkeiten der Anwendung der „activation tagging“-Methode bei der Suche nach Genen, die zur Salztoleranz oder zur Detoxifizierung von verschiedenen schädlichen Ionen führen, wie z. B. Metallionen und Ammonium.

Die Attraktivität des Verfahrens liegt dabei weiterhin in der recht einfachen und schnellen, platzsparenden und effektiven Durchführung der „tagging“-Experimente. Die Verwendung von Gewebekulturen mit Tabak-Mesophyll-Protoplasten ermöglichen ein „sreening“-Verfahren mit einer sehr hohen Anzahl an eingesetzten Zellen, die durch nur eine Person betreut werden können.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modellsystem zur Aktivierung von Pflanzengen durch die Transformation von Tabak-Mesophyll-Protoplasten mit einer T-DNA etabliert. Ein CaMV 35S-Promotor in der T-DNA induzierte die Transkription eines promotorlosen Markergens im Tabak-Genom.

Es wurden transgene *Nicotiana tabacum*-Pflanzen hergestellt, die ein promotorloses, nicht funktionales Neomycinphosphotransferase-Gen (NPTII) enthalten. Mesophyll-Protoplasten aus diesen Pflanzen wurden durch Kokultivation mit *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Der zur Aktivierung eingesetzte T-DNA Vektor besitzt einen 35S-Promotor, angrenzend an die rechte „border“ Sequenz. Ein Resistenz-Gen gegen Sulfadiazin dient der Identifizierung transgener Klone. Außerdem enthält er einen bakteriellen Replikationsursprung und ein bakterielles Markergen, die zur Reisolation von integrierter T-DNA und flankierenden Pflanzen-DNA-Sequenzen in *Escherichia coli* verwendet wurden.

Durch direkte Selektion transformierter Zellen aus der Protoplastenkultur mit Kanamycin, konnte eine Pflanze (2K<sub>r</sub>) regeneriert werden, deren Resistenz gegen dieses Antibiotikum durch die T-DNA Integration induziert wurde. Der sogenannte „plasmid rescue“ ermöglichte die Isolierung eines Plasmids aus genomischer DNA der mutierten Pflanze 2K<sub>r</sub>, das den 35S-Promotor und das benachbarte NPTII-Gen enthielt. Sequenz- und Restriktions-Analysen zeigten, daß sich der ins Genom inserierte aktivierende Promotor 0,9 kb stromaufwärts des NPTII-Startkodons befindet. Die Expression der Neomycinphosphotransferase in der Mutanten wurde mittels RT-PCR-Analyse nachgewiesen. Die Funktionalität des Plasmids konnte durch Transformation in *E. coli* belegt werden. Bakterienzellen, die dieses Plasmid enthielten, bildeten einen Kanamycin-resistenten Phänotyp aus.

In dieser Arbeit konnte die „activation T-DNA tagging“-Methode unter Verwendung von Tabak-Mesophyll-Protoplasten erstmals erfolgreich eingesetzt werden. Die Vorteile des Verfahrens liegen in der einfachen und effektiven Durchführung der Transformation, in der direkten Selektion mutierter Einzelzellen sowie in der Möglichkeit schnell gewünschte, dominante Mutationen zu erzeugen. Dabei kann nur mit einer Person die erforderliche hohe Anzahl an Zellen betreut werden.

## 6. LITERATUR

Andre, D., Colau, D., Schell, J., van Montagu, M. und Hernalsteens, J.-P. (1986) Gene tagging in plants by a T-DNA insertion mutagen that generates APH(3') II-plant gene fusions. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 512-518

Arabidopsis Genome Initiative, (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **406**, 796-815

Assaad, F. F. und Signer, E. R. (1990) Cauliflower mosaic virus P35S promoter activity in *Escherichia Coli*. *Mol. Gen. Genet.* **223**, 517-520

Baker, B., Schell, J., Lörz, H. und Fedoroff, N. (1986) Transposition of the maize controlling element „Activator“ in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4844-4848

Ballcells, L., Swinburne, J., und Coupland, G. (1991) Transposons as a tool for the isolation of plant genes. *TIBTECH* **9**, 31-37

Benfey, P. N. und Chua, N.-H. (1989) Regulated genes in transgenic plants. *Science* **244**, 174-181

Benfey, P. N. und Chua, N.-H. (1990) The Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter: Combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* **250**, 959-966

Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* **12**, 8711-8723

Borevitz, J. O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R. A. und Lamb, C. (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383-2393

Brunner, E., Brunner, D., Fu, W., Hafe, E. und Basler, K. (1999) The dominant mutation *Galzed* is a gain-of-function allele of *wingless* that, similar to loss of APC, interferes with normal eye development. *Dev. Biol.* **206**, 178-188

Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987) XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**, 376-381

- Bundock, P. und Hooykaas, P. (1998) Interactions between *Agrobacterium tumefaciens* and plant cells. In: Romeo J. T., Downum, K. R. und Verpoorte R. (Herg.) Phytochemical signals and plant-microbe interaction: recent advances in phytochemistry **32**, 207-229
- Chadwick, R., Jones, B., Jack, T. und McGinnis, W. (1990) Ectopic expression from the *Deformed* gene triggers a dominant defect in *Drosophila* adult head development. *Dev. Biol.* **141**, 130-140
- Chang, C., Kwok, S. F., Bleecker, A. B. und Meyerowitz E. M. (1993) *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**, 539-544
- Chung, J. H., Whiteley, M. und Felsenfeld, G. (1993) A 5' element of the chicken *b*-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* **74**, 505-514
- Chyi, Y.-S., Jorgensen, R. A., Goldstein, D., Tanksley, S. D. und Loaiza-Figueroa, F. (1986) Location and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 64-69
- de Buck, S., Jacobs, A., van Montagu, M. und Depicker, A. (1998) *Agrobacterium tumefaciens* transformation and cotransformation frequencies of *Arabidopsis thaliana* root explants and tobacco protoplasts. *Mol. Plant-MicrobeInteraction* **11**, 449-457
- Dellaporta, S. L., Wood, J. und Hicks, J. B. (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**, 19-21
- Denell, R. E., Hummels, K. R., Wakimoto, B. T. und Kaufmann, T. C. (1981) Developmental studies of lethality associated with the *Antennapedia* gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **81**, 43-50
- Depicker, A., Herman, L., Jacobs, A., Schell, J und van Motagu, M. (1985) Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium*/plant cell interaction. *Mol. Gen. Genet.* **201**, 477-484
- Döring, H.-P. (1989) Tagging genes with maize transposable Elements. An overview. *Maydica* **34**, 73-88



- Dovzhenko, A., Bergen, U. und 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
- Fang, Y. und Hirsch, A. M. (1998) Studying early nodulin gene *ENOD40* expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol.* **116**, 53-68
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction nuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13
- Feldmann, K. A. (1991) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant Journal* **1**, 71-82
- Feldmann, K. A. und Marks, M. D. (1987) *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 1-9
- Fridborg, I., Kuusk, S., Moritz, T. und Sundberg, E. (1999) The *Arabidopsis* dwarf mutant *shi* exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. *Plant Cell* **11**, 1019-1032
- Fritze, K. (1992) T-DNA Insertionsmutagenese mit Transkriptionverstärker-Elementen in *Nicotiana tabacum* und die genetische Analyse der Resistenz gegen Methylglyoxal-bis(guanylhydrazan). Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät an der Universität zu Köln
- Gehring, W. (1967) Bildung eines vollständigen Mittelbeins mit Sternopleura in der Antennenregion bei der Mutante *Nasobemia (Ns)* von *Drosophila melanogaster*. *Arch. JuliusKlaus Stift Vererbungsforsch. Sozialanthropol. Rassenhyg.* **41**, 44-54
- Gelvin, S. B. (1998) The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr. Opi. Biotechnol.* **9**, 227-232
- Gheysen, G., Angenon, G. und van Montagu, M. (1998) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: A scientifically intriguing story with significant applications. In: Lindsey K. (Herg.) *Transgenic Plant Research*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1-33

- Gheysen, G., Herman, L., Breyne, P., Gielen, J., van Montagu, M. und Depicker, A. (1990) Cloning and sequence analysis of truncated T-DNA inserts from *Nicotiana tabacum*. *Gene*, **94**, 155-163
- Gheysen, G., Villarroel, R. und van Montagu, M. (1991) Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes and Development* **5**, 287-297
- Goldberg, R. B., Hoschek, G. und Kamalay, J. C. (1978) Sequence complexity of nuclear and polysomal RNA in leaves of tobacco plant. *Cell* **14**, 123-131
- Grevelding, C., Becker, D., Kunze, R., von Menges, A., Fantes, V., Schell, J. und Masterson, R. (1992) High rates of *Ac/Ds* germinal transposition in *Arabidopsis* suitable for gene isolation by insertional mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6085-6089
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. Coli*. In: DNA Cloning, Vol.I (Herg. Glover, D. M.), Practical Approach Series, IRL Press
- Harling, H., Czaja, I., Schell, J. und Walden, R. (1997) A plant cation-chloride co-transporter promoting auxin-independent tobacco protoplast division. *EMBO J.*, **16**, 5855-5866
- Hayashi, H., Czaja, I., Lubenow, H., Schell, J. und Walden, R. (1992) Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth in vitro. *Science* **258**, 1350-1353
- Herman, L., Jacobs, A., van Montagu, M. und Depicker A. (1990) Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 248-256
- Hermann, L. M. F., van Montagu, M. und Depicker, A. G. (1986) Isolation of tobacco DNA segments with plant promoter activity. *Mol. Gen. Genet.* **6**, 4486-4492
- Hua, J. und Meyerowitz E. M. (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94**, 261-271
- Huang, S., Cerny, R. E., Bhat, D. S. und Brown, S. M. (2001) Cloning of an Arabidopsis patatin-like gene, *STURDY*, by activation T-DNA tagging. *Plant Physiol.* **125**, 573-584
- Ito, T. und Meyerowitz, E. M. (2000) Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, *CYP78A9*, induces large and seedless fruit in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**, 1541-1550

- Jang, J.-C. und Sheen, J. (1994) Sugar sensing in plants. *Plant Cell* **6**, 1665-1679
- Jefferson, R.A., Kvanagh, T. und Bevan, M. (1987) Gus fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J.* **6**, 3901-3907
- Kakimoto, T. (1996) CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982-985
- Kamalay, J. C. und Goldberg, R. B. (1980) Regulation of structural gene expression in tobacco. *Cell* **19**, 935-946
- Kardailsky, I., Shukla, V. K., Ji Hoon Ahn, Dagenais, N., Christensen, S. K., Nguyen, J. T., Chory, J., Harrison, M. J. und Weigel, D. (1999) Activation Tagging of the floral inducer *FT*. *Science* **286**, 1962-1965
- Kay, R., Chan A., Daly, M. und McPherson, J. (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **230**, 1299-1302
- Kluppel, M., Nagle, D. I., Bucan, M. und Bernstein, A. (1997) Long-range genomic rearrangements upstream of *Kit* dysregulate the developmental pattern of *Kit* expression in  $W^{57}$  and  $W^{\text{banded}}$  mice and interfere with distinct steps in melanocyte development. *Development* **124**, 65-77
- Knapp, S., Coupland, G., Uhrig, H., Starlinger, P. und Salamini, F. (1988) Transposition of the maize transposable element *Ac* in *Solanum tuberosum*. *Mol. Gen. Genet.* **213**, 285-290
- Koncz, C. und Schell, J. (1986) The promoter of the T<sub>i</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Körber, H., Redei, G. P. und Schell, J. (1989) High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8467-8471
- Kozak, M. (2001) New ways of initiating translation in Eukaryots? *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1899-1907

- Lee, H., Suh, S.-S., Park, E., Cho, E., Ji Hoon Ahn, Kim, S.-G., Jong Seob Lee, Young Myung Kwon und Lee, I. (2000) The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **14**, 2366-2376
- Lessel, M. und Lanka, E. (1994) Common mechanisms in bacterial conjugation and T<sub>i</sub>-DNA mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* **77**, 321-324
- Li, J., Lease, K. A., Tax, F. E. und Walker, J. C. (2001) BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5916-5921
- Logemann, J., Schell, J. und Willmitzer, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analyt. Biochemistry* **163**, 16-20
- Maliga, P., Sz.-Breznovitis, A. und Marton, L. (1973) Streptomycin resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nature* **244**, 29-30
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, G. P., Schell, J., Hohn, B. und Koncz, C. (1991) T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO Journal* **10**, 697-704
- Meyerowitz, E. M. (1992) Introduction to the *Arabidopsis* genome. In: Methods of *Arabidopsis* research. Hrg. Koncz, C., Chua, N. H. und Schell, J., World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 100-118
- Miklashevichs, E., Czaja, I., Cordeiro, A., Prinsen, E., Schell, J. und Walden, R. (1997) T-DNA tagging reveals a novel cDNA triggering cytokinin- and auxin-independent protoplast division. *Plant J.* **12**, 489-498
- Miller, M. W., Duhl, D. M., Vrieling, H., Cordes, S. p., Ollmann, M. M., Winkes, B. M. und Barsh, G. S. (1993) Cloning of the mouse *agouti* gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the *lethal yellow* mutation. *Genes Dev.* **7**, 454-467
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497

- Neff, M. M., Nguyen, S. M., Melancharuvil, E. J., Fujioka, S., Noguchi, T., Seto, H., Tsubuki, M., Honda, T., Takatsuto, S., Yoshida, S. und Chory, J. (1999) *Bas1*: a gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 15316-15323
- Odell, J. T., Nagy, F. und Chua, N.-H. (1985) Identification of DNA-sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus-35S promoter. *Nature* **313**, 810-812
- Ohtsuki, S., Levine, M. und Cai H. N. (1998) Different core promoters possess distinct regulatory activities in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **12**, 547-556
- Ow, D. W., Jacobs, J. D. und Howell, S. H. (1987) Functional regions of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4870-4874
- Payne, G. S., Bishop, J. M. und Varmus, H. E. (1982) Multiple arrangements of viral DNA and an host oncogene in bursal lymphomas. *Nature* **295**, 209-214
- Petit, A. und Tempe, (1985) The function of the T-DNA in nature. In: Molecular form and function of the plant genome (Hrg. van Vloten-Doting, L., Groot, G. und Hall, T.), Plenum Press, New York, 625-636
- Potrykus, I. und Shillito, R. D. (1986) Protoplasts: Isolation, Culture, Plant Regeneartion. *Methods in Enzymology* **118**, 549-579
- Pruitt, R. E. und Meyerowitz, E. M. (1986) Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Biol.* **187**, 169-183
- Rédei, G. P. (1992) A heuristic glance at the past of *Arabidopsis* genetics. In: Methods of *Arabidopsis* research. Hrg. Koncz, C., Chua, N. H. und Schell, J., World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 1-15
- Sambrock, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York

- Sanders, P. R., Winter, J. A., Barnason, A. R., Rogers, S. G. und Fraley R. T. (1987) Coparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopalin synthase promoters in transgenic plants. *Nucl. Acids Res.* **15**, 1543-1558
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carré, I. A. und Coupland, G. (1998) The *late elongated hypocotyl* mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**, 1219-1229
- Schell, J., Bisseling T., Dülz, M., Franssen, H., Fritze, K., John, M., Kleinow, T., Leßnick, A., Miklashevichs, E., Pawlowski, K., Röhrig, H., van de Sande, K., Schmidt, J., Steinbiß, H.-H. und Stoll, M. (1999) Re-evaluation of phytohormone-independent division of tobacco protoplast-derived cells. *Plant J.* **17**, 461-466
- Schmitz, G. und Theres, K. (1994) A self-stabilizing *Ac* derivative and its potential for transposon tagging. *Plant J.* **6**, 781-786
- Schneuwly, S., Klemenz, R und Gehring W. J. (1987) Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. *Nature* **325**, 816-818
- Sheen, J. (1990) Metabolic Repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* **2**, 1027-1038
- Smith, L. G., Greene, B., Veit, B. und Hake, S. (1992) A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1*, causes its ectopic expression in the leaf cells with altered fates. *Development* **116**, 21-30
- Suzuki, Y., Uemura, S., Saito, Y., Murofushi, N., Schmitz, G., Theres, K. und Yamaguchi I. (2001) A novel transposon tagging element for obtaining gain-of-function mutants based on a self-stabilizing *Ac* derivative. *Plant Mol. Biol.* **45**, 123-131
- Takebe, I. und Nagata T. (1984) Isolation and culture of protoplasts: tobacco. In: Vasil, I. K. (Herg.) Cell culture and somatic cell genetics of plants **1**, Academic Press, Orlando, 328-339
- Tyagi, A. K. (2001) Plant genes and their expression. *Current Science* **80**, 161-169
- van der Fits, L. und Memelink, J. (2000) ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* **289**, 295-297

- van der Fits, L., Hilliou, F. und Memelink, J (2001) T-DNA activation tagging as a tool to isolate regulators of metabolic pathway from genetically non-tractable plant species. *Transgenic Research* **10**, 513-521
- van der Graaff, E., Dulk-Ras, A. D., Hooykaas, P. J. J. und Keller, B. (2000) Activation tagging of the *LEAFY PETIOLE* gene affects leaf petiole development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **127**, 4971-4980
- Walbot, V. (1992) Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 49-82
- Walden, R., Fritze, K., Hayashi, H., Miklashevichs, E., Harling, H und Schell, J. (1994) Activation tagging: a means of isolating genes implicated as playing a role in plant growth and development. *Plant. Mol. Biol.* **26**, 1521-1528
- Weigel, D., Ahn, J. H., Blázquez, M. A., Borevitz, J. O., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Ferrándiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E. J., Neff, M. M., Nguyen, J. T., Sato, S., Wang, Z.-Y., Xia, Y., Dixon, R. A., Harrison, M. J., Lamb, C. J., Yanofsky M. F. and Chory J. (2000) Activation Tagging in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **122**, 1003-1013
- Wienand, U. und Saedler, H (1987) Plant transposable elements: using structures for gene tagging and gene cloning. In: Plant Gene Research, Plant DNA Infectious Agents (Hrg. Hohn, T. und Schell, J.), Springer-Verlag
- Wilson, K., Long, D., Swinburne, J. und Coupland, G. (1996) A *Dissociation* insertion causes a semidominant mutation that increases expression of *TINY*, an Arabidopsis gene related to *APETALA2*. *Plant Cell* **8**, 659-671
- Yoder, J. I., Palys, J., Alpert, K. und Lassner, M. (1988) *Ac* transposition in transgenic tomato plants. *Mol. Gen. Genet.* **213**, 291-296
- Zambryski, P. C. (1992) Chronicles from the *Agrobacterium*-Plant cell DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 465-490
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., van Montagu, M. und Schell, J. (1983) T<sub>i</sub> plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO Journal* **2**, 2143-2150

Zupan, J. und Zambryski, P. (1997) The *Agrobacterium* DNA transfer complex. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **16**, 279-295

Zupan, J.R. und Zambryski, P. (1995) Transfer of t-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* **107**, 1041-1047



## **DANKSAGUNGEN**

Herrn Prof. Dr. Jeff Schell, dem geistigen Vater dieser Arbeit, danke ich für seine vielfältige Unterstützung, insbesondere für Betreuung und Begutachtung der Promotionsarbeit sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. Horst Röhrig bin ich für die Überlassung des Forschungsthemas, für ausgezeichnete Betreuung des Projekts, sowie für seine vielen wertvollen Tips zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Jürgen Schmidt danke ich, für die tatkräftige Unterstützung und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Dr. Michael John danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit.

Allen weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Hauses möchte ich für die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken.

Bei Marcus bedanke ich mich ganz besonders dafür, daß er immer für mich da war.

Vielen Dank auch meiner gesamten Familie für Vertrauen und Unterstützung.

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. J. Schell betreut worden.

Teilpublikationen:

Schell, J., Bisseling T., Dülz, M., Franssen, H., Fritze, K., John, M., Kleinow, T., Leßnick, A., Miklashevichs, E., Pawlowski, K., Röhrig, H., van de Sande, K., Schmidt, J., Steinbiß, H.-H. und Stoll, M. (1999) Re-evaluation of phytohormone-independent division of tobacco protoplast-derived cells. *Plant J.* **17**, 461-466

## **Kurzzusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modellsystem zur Aktivierung von Pflanzengen durch die Transformation von *Nicotiana tabacum*-Mesophyll-Protoplasten mit einer T-DNA etabliert. Ein CaMV 35S-Promotor in der T-DNA induzierte die Transkription eines promotorlosen Markergens im Tabak-Genom. Es wurden transgene Tabak-Pflanzen hergestellt, die ein promotorloses, nicht funktionales Neomycinphosphotransferase-Gen (NPTII) enthalten. Mesophyll-Protoplasten aus diesen Pflanzen wurden durch Kokultivation mit *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Der zur Aktivierung eingesetzte T-DNA Vektor enthält neben dem 35 S-Promotor, einen bakteriellen Replikationsursprung und ein bakterielles Markergen, die zur Reisolation von integrierter T-DNA und flankierenden Pflanzen-DNA-Sequenzen in *Escherichia coli* verwendet wurden. Durch direkte Selektion transformierter Zellen aus der Protoplastenkultur mit Kanamycin, konnte eine Pflanze regeneriert werden, deren Resistenz gegen dieses Antibiotikum durch die T-DNA Integration induziert wurde. Der sogenannte „plasmid rescue“ ermöglichte die Isolierung eines Plasmids aus genomischer DNA der mutierten Pflanze, das den 35S-Promotor und das benachbarte NPTII-Gen enthielt. Sequenz-Analysen zeigten, daß sich der ins Genom inserierte aktivierende Promotor 0,9 kb stromaufwärts des NPTII-Startkodons befindet. Die Funktionalität des Plasmids konnte durch Transformation in *E. coli* belegt werden. Bakterienzellen, die dieses Plasmid enthielten, bildeten einen Kanamycin-resistenten Phänotyp aus.

In dieser Arbeit konnte die „activation T-DNA tagging“-Methode unter Verwendung von Tabak-Mesophyll-Protoplasten erstmals erfolgreich eingesetzt werden. Die Vorteile des Verfahrens liegen in der einfachen und effektiven Durchführung der Transformation, in der direkten Selektion mutierter Einzelzellen sowie in der Möglichkeit schnell gewünschte, dominante Mutationen zu erzeugen. Dabei kann nur mit einer Person die erforderliche hohe Anzahl an Zellen betreut werden.

## Abstract

Activation T-DNA tagging has been applied to *Nicotiana tabacum* mesophyll protoplasts. A promoterless inactive marker gene (neomycinphosphotransferase, NPTII) was integrated into the tobacco genome. Mesophyll protoplasts, isolated of these plants, have been transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. A T-DNA vector containing a cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter has been used to generate a mutant cell line from which a plant was regenerated by selecting for growth in the presence of kanamycin. The deregulated expression of the kanamycin resistance gene flanking the T-DNA tag in the mutant plant genome is responsible for the antibiotic resistance. To demonstrate this, plant DNA carrying the T-DNA tag, together with an origin of replication and an antibiotic marker gene functional in *Escherichia coli* was rescued. Sequence analysis of the rescued DNA fragment showed that the NPTII gene is located adjacent to the inserted CaMV 35S promoter at a distance from 0,9 kb. This rescued DNA plasmid was able to confer kanamycin resistance to *E. coli* after retransformation.

This work presents the first successful approach of activation T-DNA tagging using tobacco mesophyll protoplasts. Protoplast cocultivation provides a means to generate a large number of transgenic individuals with ease only by one person. Biochemical selection can be applied to the stage of protoplast growth in tissue culture. The described method allows screenings for specific phenotypes at the level of the primary transformant.

## LEBENS LAUF

### *Zur Person:*

Name	Marion S t o l l
Geburtsdatum	09. 03. 1971
Geburtsort	Mayen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### *Schul Ausbildung:*

1977-1981	Grundschule Hinter Burg in Mayen
1981-1990	Megina Gymnasium in Mayen Abschluß durch Allgemeinen Hochschulreife

### *Berufsausbildung:*

10/90-03/97	Studium 'Biologie' an der Universität des Saarlandes, Saarbücken Diplomarbeit am Lehrstuhl für Allgemeine Mikrobiologie bei Prof. Dr. H. Kaltwasser an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Thema „Toxizitätsstudien zum mikrobiellen Heizölabbau im Boden“, Gesamtnote „mit Auszeichnung“
04/97-03/98	Beginn einer Dissertation bei Dr. R. Walden am Max-Planck- Institut für Züchtungsforschung in Köln
04/98-02/02	Anfertigung der vorliegenden Dissertation bei Prof. Dr. J. Schell am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln