

Untersuchungen transienter Transformanten

VON

Physcomitrella patens (Hedw.) B.S.G.

Diplomarbeit

von

Necla Birgül

Institut für Allgemeine Botanik und Botanischer Garten

Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

Hamburg 1997

Diplomarbeit
Universität Hamburg
Institut für Allgemeine Botanik
und Botanischer Garten

Untersuchungen transienter Transformanten

von

***Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.**

Diplomarbeit

von

Necla Birgül

Institut für Allgemeine Botanik und Botanischer Garten

Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

Hamburg 1997

Dipl. 1997/14
Universität Hamburg
Institut für Allgemeine Botanik
und Botanischer Garten

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen

1. Einleitung

1.1.	Rekombination allgemein	6
1.1.1.	Homologe Rekombination	6
1.1.2.	Sequenzspezifische Rekombination	7
1.1.3.	Illegitime Rekombination	8
1.2.	Rekombination in <i>Physcomitrella</i>	9
1.3.	Methylierung als ein die Rekombination beeinflussender Faktor	11
1.4.	Zur Transformation verwendete Intronkonstrukte	11
1.5.	Zielsetzung	12

2. Material und Methoden

2.1.	Chemikalien und Enzyme	13
2.2.	Computerprogramme	13
2.3.	Pflanzliches Material und Kulturbedingungen	13
2.3.1.	Pflanzliches Material	13
2.3.2.	Pflanzliche Gewebekultur und Kulturmedien	13
2.3.3.	Für die Homogenisation verwendetes Homogenisationsgerät mit Homogenisationsbehälter	14
2.4.	Biolistische Transformation	15
2.4.1.	Einteilung des Stabilitätsgrades nach einer biolistischen Transformation	17
2.5.	Bakterienstämme und Plasmide	18
2.5.1.	Bakterienstämme	18
2.5.2.	Plasmide	18
2.5.3.	Plasmidisolierung	22
2.5.3.1.	Minipräparation von Plasmiden	22
2.5.3.2.	Maxipreparation von Plasmiden	23
2.6.	Kultur von <i>E.coli</i>	23
2.6.1.	Übernachtskulturen	23
2.6.2.	Kompetente Zellen	23
2.6.3.	Kryokultur	24
2.7.	Histochemischer Gus-Test	24
2.8.	Transformation in <i>E.coli</i> durch Elektroporation	24
2.9.	Isolierung genomischer DNA	25
2.10.	Restriktionsverdau der DNA mit Endonukleasen	26
2.11.	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.11.1.	Eluierung der DNA Fragmente aus dem Agarosegel	26

2.12.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26
2.12.1.	Photometrische Messung	26
2.12.2.	Konzentrationsbestimmung im Agarosegel	27
2.13.	Eingesetzte Gensonde für die Southern Hybridisierung	27
2.13.1.	Gensonden	27
2.13.2.	Markierung der Gensonden	27
2.14.	Southern-Blot und Hybridisierung	28

3. Ergebnisse

3.1.	Überprüfung der Intronkonstrukte zur Transformation	30
3.2.	Bei der biolistischen Transformation erhaltene Transformationsraten mit den NPTII-Intronkonstrukten	31
3.2.1.	Durch die biolistische Transformation erhaltene Transformationsraten	31
3.3.	Überprüfung der stabilen Transformanten	36
3.3.1.	Histochemischer Gus Test	36
3.4.	DNA-Isolierung der stabil transformierten Pflanzen Nar/pBI221:23 und Bar/pBI221:23	37
3.4.1.	Charakterisierung der extrachromosomalen Fragmente (Plasmide) in der unrestringierten genomischen DNA	37
3.4.2.	Southern-Analyse der unrestringierten genomischen DNA	38
3.4.2.1.	Elution der extrachromosomalen Fragmente (Plasmide) aus dem Agarosegel	38
3.4.2.2.	Transformation der extrachromosomalen Fragmente (Plasmide) durch Elektroporation in <i>E.coli</i>	39
3.4.2.3.	Erhaltene Transformationsraten durch Elektroporation	39
3.4.2.4.	Plasmid-Isolierung aus der Übernachtskultur	39
3.4.2.5.	Restriktionsanalyse der extrachromosomalen Fragmente	40
3.4.2.6.	Gelelektrophoretische Auftrennung der extrachromosomalen Fragmente	41
3.4.2.7.	Tabellarische Darstellung der Restriktionsanalyse aus den Plasmiden <i>pBI221:23</i> , <i>Bar /pBI221:23/4Kb</i> , <i>Bar /pBI221:23/2Kb</i> , <i>Nar /pBI221:23/4Kb</i> und <i>Nar /pBI221:23/2Kb</i> ,	43
3.4.2.8.	Erstellung der Restriktionskarten aus den Plasmiden <i>pBI221:23</i> , <i>Bar /pBI221:23/4Kb</i> , <i>Bar /pBI221:23/2Kb</i> , <i>Nar /pBI221:23/4Kb</i> und <i>Nar /pBI221:23/2Kb</i> ,	45
3.4.3.	Southern-Analyse der Plasmide <i>pBI221:23</i> , <i>Bar /pBI221:23/4Kb</i> , <i>Bar /pBI221:23/2Kb</i> , <i>Nar /pBI221:23/4Kb</i> und <i>Nar /pBI221:23/2Kb</i> mit dem Hygromycingen als Hybridisierungssonde	47
3.4.3.1.	Gelelektrophoretische Analyse der Plasmide <i>pBI221:23</i> , <i>Bar /pBI221:23/4Kb</i> , <i>Bar /pBI221:23/2Kb</i> , <i>Nar /pBI221:23/4Kb</i> und <i>Nar /pBI221:23/2Kb</i>	47

3.4.3.2.	Southern-Blot der Plasmide <i>pBI221:23</i> , <i>Bar/pBI221:23/4Kb</i> , <i>Bar/pBI221:23/2Kb</i> , <i>Nar /pBI221:23/4Kb</i> und <i>Nar /pBI221:23/2Kb</i> mit dem Hygromycingen	49
4.	Diskussion	53
5.	Zusammenfassung	58
6.	Literaturverzeichnis	59

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
abs.	Absolut
Amp.	Ampicillin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CSPD	3-(4-metoxyspiro(1,2-dioxetan-3,2(5' chloro)tricyclo(3.3.1.1 ³ ,7)decan)-4-yl)
Kb(p)	Kilobasen (paare)
LB	Luria-Bertani-Medium
m/μ/n/p/f	Milli/mikro/nano/piko/femto
min	Minuten
nt	Nukleotide
nos	Nopalinsynthase (-Gen)
NPTII	Neomycinphosphotransferase II (-Gen)
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
ocs	Octopinsynthase (-Gen)
PEG	Polyethylenglykol
<i>P. patens</i>	<i>Physcomitrella</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotation pro Minute
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-ammoniummethan
TAC	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
U	Units
UV	Ultraviolett
ü.N.	Über Nacht
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid

Die Maßeinheiten wurden nach dem SI-System (Cordes, 1972) verwendet. Weitere Abkürzungen (für Lösungen) sind im Text erklärt.

1. EINLEITUNG

1.1. Rekombination allgemein

Die DNA-Sequenzen in den Zellen bleiben mit sehr geringen Änderungen von Generation zu Generation erhalten. Diese genetische Stabilität ist zwar für das kurzfristige Überleben unentbehrlich, auf lange Sicht aber hängt das Weiterleben der Organismen wahrscheinlich von der genetischen Variabilität ab, die ihnen die Anpassung an eine sich verändernde Umwelt ermöglicht. Ein besonders wichtiges Merkmal der DNA in den Zellen ist daher ihre Fähigkeit, sich neu zu ordnen und damit sowohl die Genkombination als auch Zeitpunkt und Stärke der Genexpression in jedem einzelnen Genom zu variieren. Solche DNA-Umordnungen kommen durch genetische Rekombination zustande.

DNA-Rekombination bedeutet Neukombination der genetischen Information. Sie ist eine Fähigkeit, die alle Prokaryoten, Eukaryoten und auch Viren besitzen, und eine Voraussetzung für die Entstehung der Vielfalt der Organismen (Sancer & Sancer, 1988). Weiterhin ist die Rekombination an der DNA-Reparatur und der Regulation beteiligt (Glasgow et al., 1989). Genetische Rekombination kann in drei Kategorien eingeteilt werden.

1.1.1. Homologe Rekombination

Die homologe Rekombination findet ausschließlich zwischen DNA-Segmenten mit nahezu identischen oder homologen Nukleotidsequenzen statt. Ein Beispiel ist die chromosomale Rekombination während der Meiose (Übersichtsartikel von Giroux, 1988), die zu Variationen der Nachkommenschaft in der sexuellen Fortpflanzung beiträgt. Zwischen homologen Sequenzen kann es entweder zu einem wechselseitigen Austausch der Information kommen (Crossing-over), wobei sich die Information beider beteiligter DNA-Segmente ändert, oder zu einer Genkonversion, bei welcher ein Rekombinationsprodukt gleich bleibt, während das andere verändert wird (auch nichtreziproker Austausch). Die Genkonversion kann besonders gut in Pilzen beobachtet werden (Übersichtsartikel von Hastings, 1988), wobei alle Rekombinationsprodukte isolierbar sind. Für die Stabilität des Genoms ist die homologe Rekombination wichtig als möglicher Reparaturprozeß (Sancer & Sancer, 1988).

Die Analyse der extrachromosomalen Rekombination basiert häufig auf der homologen Rekombination zwischen nichtfunktionellen Partnern und der anschließenden Integration des entstandenen selektierbaren Markergens ins Genom. Neben diesen integrationsabhängigen Versuchsansätzen wurde homologe Rekombination auch transient mittels RNase-Schutz-Analyse (Bilang et al., 1992), der PCR-Reaktion (Puchta & Hohn, 1991) und einem Gus-Enzym-Test (Puchta & Hohn, 1991; Lyznik et al., 1991) nachgewiesen. Die Voraussetzung für homologe Rekombination bei Pflanzen ist ein homologer Bereich über mindestens 53 Bp für die extrachromosomale, intermolekulare (Baur et al., 1990) sowie für die intrachromosomale Rekombination (Peterhans et al., 1990). In Säugerzellen konnte auch für eine Homologie über 25 Bp noch Rekombination nachgewiesen werden (Ayares et al., 1985).

Für beide Zelltypen besteht zudem eine positive Korrelation zwischen der Länge der Homologie und der Rekombinationsfrequenz (Baur et al., 1990, Puchta & Hohn, 1991, Rubnitz & Subramani, 1984, Ayares et al., 1985).

Es ist ein genereller Befund für tierische und pflanzliche Zellen, daß sich Doppelstrangbrüche innerhalb oder in der Nähe der homologen Region positiv auf die extrachromosomale Rekombination auswirken (Bollag et al., 1989; Subramani & Seaton, 1988; Baur et al., 1990; Lyznik et al., 1991; Engels und Meyer 1992; Bilanz et al., 1992). Mit Hefe als Modelorganismus (Orr-Weaver et al., 1981) entwickelten Szostak et al., (1983) das Doppelstrangbruchreparatur(DSBR)-Modell. Ausgehend von einem einleitenden Doppelstrangbruch innerhalb der homologen Regionen entsteht durch die Aktivität von Exonukleasen eine Lücke in einem DNA-Doppelstrang, welche mit Hilfe des anderen homologen Stranges repariert wird. Die entstehende Holliday-Struktur (Holliday, 1964) wird in einem konservativen Mechanismus, d.h. ohne den Verlust von Information, aufgelöst, entweder mit oder ohne den Austausch von flankierenden Markern.

Ein zweites Modell (Single-Strand-Annealing“ (SSA)-Modell nach Lin et al., 1984) setzt Doppelstrangbrüche in beiden homologen Bereichen voraus. Durch strangspezifische Exonukleasen werden die komplementären, homologen Stränge freigelegt und können miteinander paaren. Nach der Reparatursynthese bleibt ein Molekül übrig (nichtkonservativer Prozeß), wobei die flankierenden Marker in jedem Fall ausgewechselt werden. Bei einer Variante des SSA-Modells können die komplementären Bereiche auf den beiden Strängen auch durch eine Helikase-Aktivität anstelle einer Exonuklease-Tätigkeit herausgehoben werden (Wake et al., 1985). In beiden Modellen ist die Lage des Doppelstrangbruchs relativ zur homologen Region von Bedeutung für die Effektivität der Rekombination. Der größte Teil der in Tabak untersuchten extrachromosomalen Rekombinationsereignisse kann eher mit dem SSA-Modell nach Lin et al., (1984) erklärt werden (Übersichtsartikel von Puchta & Meyer, 1994), es gibt aber auch Belege für Ereignisse nach dem DSBR-Modell (de Groot et al., 1992). Für andere Pflanzensysteme wie Mais und Petunie werden beide Modelle diskutiert (Lyznik et al., 1991; Engels & Meyer, 1992).

1.1.2. Sequenzspezifische Rekombination

Bei der sequenzspezifischen Rekombination sind die Rekombinationsereignisse auf bestimmte Stellen des Genoms beschränkt. Sie ist nicht auf homologe Regionen angewiesen und wird von systemspezifischen Proteinen durchgeführt, die unabhängig von der homologen Rekombinationsmaschinerie arbeiten (Craig, 1988).

Dazu gehört u.a. die Entstehung der Antikörpervielfalt in Säugern (Tonegava, 1988) oder die Integration des Lambda-Phagen in das *E.coli*-Genom (Thompson & Landy, 1989).

1.1.3. Illegitime Rekombination

Die illegitime Rekombination oder die nicht-homologe Rekombination beruht nicht (Franklin, 1971) bzw. nur in geringem Maß (Anderson, 1987) auf kurzen Sequenzhomologien. Sie wird verantwortlich gemacht u.a. für die Entstehung von Deletionen, Insertionen und Duplikationen. Eine Übersicht über illegitime Rekombinationsereignisse in Säugern geben Roth & Wilson (1988), sowie Meuth (1989). Für Prokaryoten haben Ehrlich (1989) und Allgood & Silhavy (1988) die bisherigen Ergebnisse zusammengefaßt. Man kann weiterhin differenzieren zwischen chromosomaler Rekombination (innerhalb oder zwischen Chromosomen) und extrachromosomaler Rekombination, die außerhalb des Genoms stattfindet. Die extrachromosomale Rekombination kann außerdem in intra- und intermolekulare Rekombination unterteilt werden.

Die illegitime Rekombination umfaßt nach Roth & Wilson (1988) alle genetischen Umstellungen, welche nicht auf homologer oder sequenzspezifischer Rekombination beruhen. Sie benötigt keine oder nur sehr geringe Sequenzhomologien. Beispiele für illegitime Rekombinationsereignisse sind zufällige Integrationen von fremder DNA ins Genom (Roth & Wilson, 1988; Shilito et al., 1985; Negrutiu et al., 1987) sowie Deletionen oder Umstellungen der chromosomalen Gene (Meuth, 1989; Bouffler et al., 1993). Franklin hat schon 1967 zwei Modelle für die illegitime Rekombination formuliert:

- 1.) Durch falsche Basenpaarung („slipped mispairing“) werden DNA-Regionen während der Replikation übergangen.
- 2.) Fehler bei DNA-Brüchen und Wiedervereinigung können zu Deletionen führen.

Die aktuellen Modelle sind etwas spezifischer und detaillierter. Ehrlich (1989) hat die Kombination von DNA-Brüchen und DNA-Replikation neben den beiden Vorgängen allein für die illegitime Rekombination verantwortlich gemacht. Roth & Wilson (1988) sehen die illegitime Rekombination als ein Prozeß in zwei Schritten: Als erstes entstehen freie DNA-Enden, hauptsächlich nach Fehlern im DNA Metabolismus (Replikation, Reparatur, Transkription, Rekombination), diese werden dann im zweiten Schritt wieder verbunden, unabhängig von den terminalen Sequenzen. Experimentelle Ansätze sollten die Detektion von heterogenen Rekombinationsprodukten erlauben, weil illegitime Rekombinationsereignisse nicht unbedingt an bestimmten Stellen stattfinden. Dazu wurden bisher die Deletion von inhibitorischen Sequenzen (Porter et al., 1990), selektierbaren Markergenen (Bae et al., 1991), oder die Rekombination innerhalb eines Introns (Roth & Wilson, 1988) als Methoden angewendet.

Da illegitime Rekombination häufig doch nicht ganz zufällig im Genom stattfindet (z.B. Farabaugh et al., 1978, Roth & Wilson 1988, Bouffler et al., 1993), hat man versucht, Elemente zu identifizieren, die am Auftreten von illegitimen Rekombinationsereignissen beteiligt sind. Dazu wurden in der Regel die Sequenzen vor und nach der Umordnung miteinander verglichen.

Die untersuchten Stellen illegitimer Rekombination enthielten eine Vielzahl verschiedener DNA-Motive: u.a. kurze direkte Sequenzwiederholungen (Nalbantoglu et al., 1986; Canning & Dryja, 1989; Mayerhofer et al., 1991; Gheysen et al., 1991; Thacker et al., 1992), alternierende Purin/Pyrimidin-Sequenzwiederholungen (Boehm et al., 1989; Kitamura et al., 1991; Sary & Sarasin, 1992), Polypurin- bzw. Polypyrimidin-Abschnitte (Konopka, 1988), AT-reiche DNA-Regionen (Hyrien et al., 1987; Sary & Sarasin, 1992), interstiale Telomersequenzwiederholungen (Bouffler et al., 1993; Katinka & Bourgain, 1992), repetitive Sequenzen der Alu-Familie (Lehrman et al., 1985; Sary & Sarasin, 1992), Topoisomerase-II-Bindungsstellen (Bae et al., 1991) und invertierte Sequenzwiederholungen bzw. Palindrome. Keines der gefundenen DNA-Motive ist jedoch durchgehend an nicht-homologer Rekombination beteiligt. Allerdings beeinflussen viele von ihnen die lokale DNA-Struktur (Milot et al., 1992), z.B. können alternierende Purin/Pyrimidin-Wiederholungen die Z-Konformation der DNA annehmen (Bouffler et al., 1993), ebenso Polypurin- oder Polypyrimidin Segmente (Konopka, 1988). Die illegitime Rekombination könnte also eher von der DNA-Struktur als von der Sequenz beeinflusst werden, woraufhin Milot et al., (1992) den Zusammenhang zwischen gebogenen DNA-Elementen und illegitimen neuen DNA-Verbindungen untersucht und eine positive Korrelation festgestellt haben.

1.2. Rekombination in *Physcomitrella*

Das Laubmoos *Physcomitrella* gehört zur Gruppe der Bryophyten, einer kleinen pflanzlichen Gruppe, die über kein Gefäßsystem verfügt und extreme Umwelteinflüsse toleriert. Als erfolgreiches Modellsystem für Untersuchungen in der Entwicklungsphysiologie wurde *Physcomitrella* schon in den 20er und 30er Jahren erkannt (Dyer & Duckett, 1984; Wang & Cove, 1989). *Physcomitrella* eignet sich besonders gut als Modellorganismus, weil im Fortpflanzungszyklus die haploide Phase dominiert, welcher genetische Studien erleichtert.

Die genetische Transformation stellt ein essentielles Werkzeug für die moderne molekulare Genetik dar (Übersichtsartikel Ashton et al., 1994). In *Physcomitrella* konnte erstmals über die PEG-Transformation 1991 berichtet werden (Schäfer et al., 1991). Über die PEG-Transformation konnte in *Physcomitrella* 1997 ein Gen ausgeschaltet werden. Schäfer & Zyrd klonierten genomische Sequenzen, welche homologe Sequenzen in den flankierenden Regionen enthielten. Sie gehen davon aus, daß es zu einer homologen Rekombination gekommen ist, da sie zehn Pflanzen klonierten, wovon neun die Kanamycin Resistenz aufwiesen. Sie konnten jedoch im Phänotyp keine Änderung feststellen. Durch das „knock out“ hat man die Möglichkeit die Funktion der Gene zu studieren, wobei die Phänotyp-Änderung relevant ist.

Um eine effiziente Transformation zu erreichen, ist eine Sequenzhomologie zwischen der transformierten Sequenz und der Zielsequenz essentiell (Schäfer & Zyrd, 1997). Die effektive Transformation durch die biolistische Transformation wurde durch Sawahel et al. (1992) etabliert. Weiterhin wurde durch die Arbeitsgruppe Cove in Leeds die Definition und Etablierung der unterschiedlichen Transformanten in *Physcomitrella* durch die biolistische Transformation erweitert. Die aus der biolistischen Transformation resultierenden Transformanten können transient, nichtstabil und stabil sein (Übersichtsartikel von Knight, 1994):

- **Transiente Transformanten** lassen sich nach der ersten Subkultur nur auf Selektivmedium sehen. Sie überleben nur kurze Zeit, d.h. eine zweite Subkultur auf Selektivmedium überleben sie nicht. Etwa 50% der Regeneranten sind in diesem Sinne transient.
- **Nichtstabile Transformanten** überleben mehrere Subkulturen, wachsen aber nicht so schnell und kontinuierlich wie die stabilen Regeneranten. Sie wachsen nur auf Selektivmedium, d.h. sobald sie auf nichtselektives Medium überführt werden, sterben sie ab. Bei fehlendem kontinuierlichen Selektionsdruck verlieren sie ihren Phänotyp bzw. das Plasmid. Dies läßt vermuten, daß das Plasmid extrachromosomal lokalisiert ist (pers. Mitteilung durch C.D.Knight). Der prozentuale Anteil dieser Regeneranten (45%) an den gesamten Transformanten ist sehr hoch, weshalb großes Interesse besteht, dieses Phänomen aufzulösen.
- **Stabile Transformanten** überleben jeden Transfer der Subkulturen in Selektiv- und Nichtselektivmedium, eine Integration des Plasmid in das Genom ist bewiesen. Die Anzahl dieser Art von Transformanten ist sehr gering und macht nur 3-5% aller Transformanten aus.

1.3. Methylierung als ein die Rekombination beeinflussender Faktor

Die biologische Signifikanz der C5-Methylierung des Cytosin in Eukaryoten wird zunehmend untersucht (Übersichtsartikel von Doerfler et al., 1990; Selker 1990). Vor allem sind pflanzliche Genome sehr stark methyliert (Gruenbaum et al., 1981). Insbesondere kann der Methylierungsstatus von eukaryotischen Sequenzen mit der Genexpression korrelieren. So wird die Expression von Transgenen in Tabak durch Promotormethylierung inhibiert (Weber et al., 1990; HersHKovitz et al., 1990). Es wird postuliert, daß die C-Methylierung in der Interaktion zwischen DNA und Proteinen liegt (Doerfler et al., 1990), da sie offenbar die Struktur der lokalen DNA-Sequenz ändert. Sie könnte daher über die Zugänglichkeit der DNA für Enzyme auch die Rekombination beeinflussen. Allerdings konnten Puchta et al., (1992) keine Inhibierung der homologen, extrachromosomalen Rekombination feststellen.

In einigen Fällen konnte die C-Methylierung der endogenen Pflanzengene und die Transgene durch Zugabe von 5-Azacytidin - ein C-Methylierungs-Inhibitor - ins Medium, reaktiviert werden (Burn et al., 1993; Galaud et al., 1993; Palmgren et al., 1993).

In *Physcomitrella* wurde durch Zugabe von 5-Azacytidin ins Medium in einer Konzentration von 2-500mM versucht, die nichtstabil transformierten Transformanten zu erhalten (Ashton et al., 1994). In keinem Fall war es möglich die Subkulturen aufrecht zu erhalten, wobei die DNA-Methylierung in *Funaria hygrometrica* (gehört zur gleichen Familie wie *Physcomitrella*) durch Zugabe von 5-Azacytidin ins Medium eine Reduktion aufwies (Übersichtsartikel von Ashton, 1994).

1.4. Zur Transformation verwendete Intronkonstrukte

Die in dieser Arbeit verwendeten Intronkonstrukte wurden ursprünglich während der Doktorarbeit von Ralph Jürgen Hörold an der Universität Köln (AG Priv.-Doz. Dr. P. Meyer) im NPTII Gen konstruiert, um die Expressionsstabilität durch Unterbrechung homologer Regionen in der Tabakpflanze der Linie *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1 (Maliga et al., 1973) zu studieren.

Das Konstrukt PT13d2 leitet sich ab von pBR322 (Bolivar et al., 1977) und alle anderen Konstrukte basieren auf dem Konstrukt PT13d2, wobei hier die Position und die Zahl der Intronen unterschiedlich ist. In der Arbeit von Herrn Hörold wurde nach einer Transformation (PEG-Fusionstechnik, Hein et al., 1983; Meyer et al., 1985) durch die Intronkonstrukte in *N. tabacum* im Vergleich zu Intronfreien Konstrukten keine signifikante Erhöhung der Transformationsraten erzielt. Die im NPTII-Gen positionierten Intronkonstrukte sind in Tab.1 dargestellt.

VEKTOR	GRÖSSE (BP)	INTRON-POSITION			ANMERKUNG
		37 / 38	229 / 230	622 / 623	
pT13d2	3789	--	--	--	
pINS2	3885	Intron	--	--	
pINS3	3885	--	Intron	--	
pINS4a	3885	--	--	Intron	AT-Sequenz der Exonsequenz erhöht*
pTRIN	4077	Intron	Intron	Intron	

Tab.1 Im NPTII-Gen positionierten Intronkonstrukte

* Die pflanzliche Prä-mRNA Introns haben ein hohen Gehalt an A- und U-Sequenzen.

1.5. Zielsetzung

In dieser Arbeit soll durch die biolistische Transformation (Sawahel et al., 1992) mit den oben vorgestellten Intronkonstrukten im NPTII-Gen das Moos *Physcomitrella* transformiert werden. Der Ort der Replikation für die Plasmide soll ermittelt werden, entweder findet die Replikation im Kern oder in den Organellen statt. Die Intronen können nur im Kern herausgespleist werden. Um ein Protein zu synthetisieren, muß die gesamte Länge des Gens, sowohl Exone wie Intronen, in ein sehr langes RNA-Molekül transkribiert werden. Bevor dies RNA-Molekül den Kern verläßt, entfernt der Komplex der RNA bearbeitenden Enzyme alle diese Intron-Sequenzen und bildet dadurch ein viel kürzeres RNA-Molekül. Diese Genaktivität kann man nach einer Transformation und entsprechender Selektion durch Kanamycin bei Erhalt von Pflanzen beobachten. Bei Erhalt von Kanamycin resistenten Pflanzen, wobei der Stabilitätsgrad nicht relevant ist, kann man davon ausgehen, daß die Prozessierung des Transkriptes im Kern erfolgt ist.

Da die Anzahl der nichtstabil transformierten Pflanzen in *Physcomitrella* sehr hoch ist, sollte die mögliche Steuerung der Regulation vom Kern oder Organellen untersucht werden. Darüber hinaus sollten die stabil transformierten Kulturen durch Southern Analyse studiert werden, um die mögliche Integration des Plasmides zu beobachten.

2.3. Pflanzliches Material und Kulturbedingungen

2.3.1. Pflanzliches Material

Für alle Experimente wurden Moospflanzen der Linie *Physcomitrella patens* (Hofle 33.3) aus der Sammlung des Arbeitsbereichs Genetik der Universität Leeds (Department of Genetics, University of Leeds, LS2 633F, UK) verwendet.

2.3.2. Pflanzliche Gewebekultur und Kulturbedingungen

Für die Arbeit häufig verwendete Kulturbedingungen sind an dieser Stelle aufgelistet. Zusätzlich werden einige Reagenzien und Lösungen in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

BCD-Medium	Lösung B	10ml
	Lösung C	10ml
	Lösung D	10ml
	Agar	2g
	CaCl ₂	100ml
	ad H ₂ O	

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien und Enzyme

Die im folgenden aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München) und Serva (Heidelberg), die verwendeten Restriktionsenzyme von den Firmen AGS (Heidelberg), Boehringer (Mannheim) und Pharmacia (Freiburg) bezogen. Alle weiteren Hersteller werden gesondert aufgeführt.

Das für die Lösungen verwendete Wasser entstammte einer Millipore Aufbereitungsanlage von der Firma Milli-Q Water Systems (Millipore, Eschborn) und wird im folgenden als H₂O bezeichnet (AG Reski). Das verwendete Wasser in der AG Cove wurde 20 min bei 120°C und 2×10^5 Pa autoklaviert. Die zu autoklavierenden Medien wurden 20 min bei 120°C und 2×10^5 Pa sterilisiert.

2.2. Computerprogramme

Für die Textverarbeitung wurde Microsoft Word für Windows 7.0 und die Grafischen Darstellungen mit Corel Draw 7.0 angefertigt. Die Auswertung von Meßergebnissen sowie Tabellen wurde mit Microsoft Exel 5.0 durchgeführt.

2.3. Pflanzliches Material und Kulturbedingungen

2.3.1. Pflanzliches Material

Für alle Experimente wurden Moospflanzen der Linie *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. aus der Sammlung des Arbeitsbereiches Genetik der Universität Leeds (Department of Genetics, University of Leeds, LS2 68JF, UK) verwendet.

2.3.2. Pflanzliche Gewebekultur und Kulturmedien

Für die Arbeit häufig verwendete Kulturmedien sind an dieser Stelle aufgelistet. Zusätzlich werden einige Reagenzien und Lösungen in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

BCD-Medium:	Lösung B	10ml
	Lösung C	10ml
	Lösung D	10ml
	Agar	8g
	CaCl ₂	1mM
		ad 1l H ₂ O

Lösung B:	MgSO ₄ ·7H ₂ O	25g Ad 1l H ₂ O
Lösung C:	KH ₂ PO ₄	25g ad 1l H ₂ O
Lösung D:	KNO ₃ FeSO ₄ ·7H ₂ O	101g 1.25g ad 1l H ₂ O

Die Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen auf Festmedien (BCD-Medium) in Petrischalen (mit autoklavierte Cellophanfolien bedeckt) nach den Standard Leeds Methoden (*Physcomitrella patens* methods, Cove, 1995) herangezogen. Die Temperatur während der Anzucht betrug 24-26°C bei einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16 Stunden Licht (zwischen 5 und 20Wm⁻² Weißlicht) und 8 Stunden Dunkelheit. Die zur Transformation verwendeten fünf bis sieben Tage alten Subkulturen wurden mit einem Homogenisator (Abb.1 und Abb.2) in 10ml sterilem H₂O zerkleinert und jeweils 3ml auf mit Cellophanfolie bedecktem BCD-Medien beimpft.

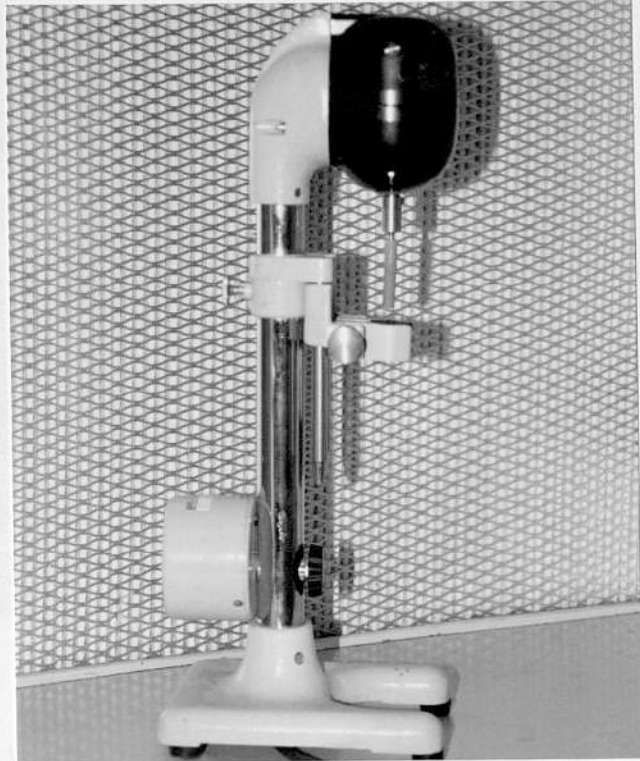
2.3.3. Für die Homogenisation verwendetes Homogenisationsgerät mit Homogenisationsbehälter

Im Homogenisationsbehälter ist ein Messer plziert, das durch die Rotation die Zerkleinerung der Mooskulturen ermöglicht. Diese Mooskulturen werden zur Subkultur in BCD-Medien beimpft. Nach fünf bis sieben Tagen können sie zur biolistischen Transformation sowie DNA-Isolation verwendet werden.



Abb.1 Homogenisationsbehälter, worin die Pflanzenkulturen in H₂O zerkleinert und zur Subkultur verwendet wurde.

Abb.2 Homogenisationsgerät, womit die Pflanzkulturen zerkleinert und zur Subkultur verwendet wurde.

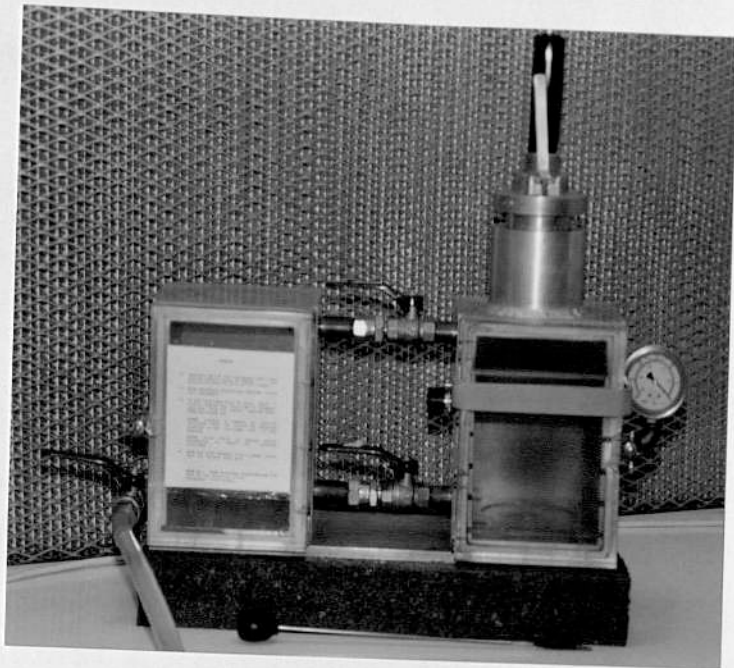


2.4. Biolistische Transformation

Bei der biolistischen Transformation (Sawahel et al., 1992) werden Wolfram-Kügelchen mit der zur Transformation verwendeten Plasmid-DNA ummantelt. Sie binden an eine Teflon-Patrone geheftete Mikroprojekte (macroprojectiles of polycarbonate, Turner-Richards, Birmingham, England) die abgefeuert werden. Zur Beschleunigung der Mikroprojekte wird Heliumgasdruck verwendet, bei dem der Druck in einem Zylinder gesammelt wird, welcher von einer Membran abgeschlossen ist. Bei einem bestimmten Druck (28mbar) reißt die Membran und die Heliumdruckwelle wird schlagartig freigesetzt.

Unterhalb der Membran befindet sich ein Halter, an dem eine Folie plaziert ist (Makroprojektil), wo auch die Transformationssuspension aufgetragen wird. Durch die Druckwelle wird die Folie auf ein Netz geschleudert, an dem sie zurück gehalten wird, während die Mikroprojekte auf die unterhalb des Netzes plazierten Zellen geschossen wird. Das biolistische Transformationsgerät entsprach dem Model von Lonsdale et al., (1990).

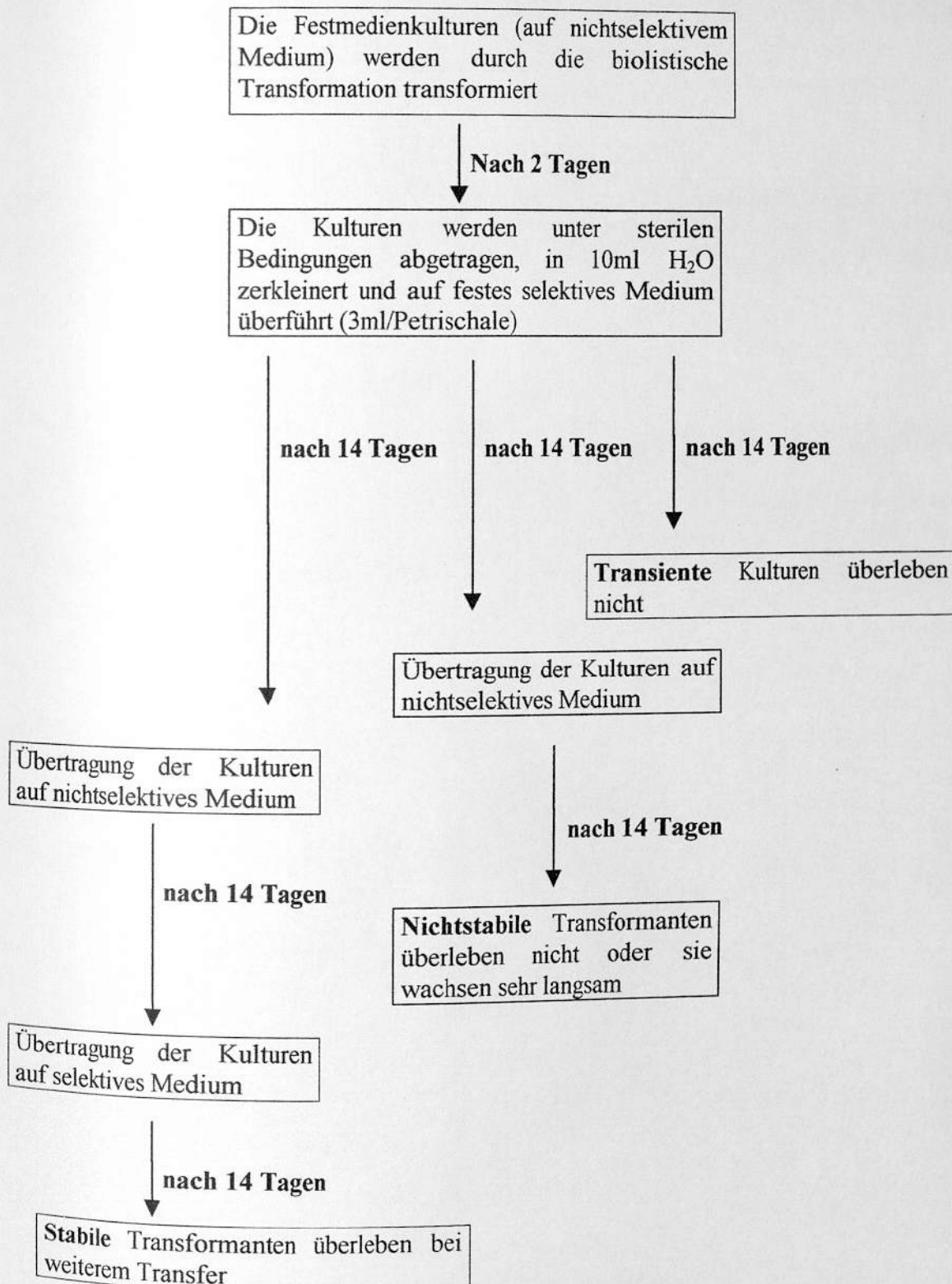
Abb.3 Für die biolistische Transformation verwendetes Transformationsgerät (Sheerline Precision Engineering Ltd., Cambridge Road, Milton, Cambridge CB4 4AT, England).



Für die Wolframsuspension wurden 50mg Wolfram Puder (M17, Sylvania, Towanda, PA 18848, USA) in 300µl abs. Ethanol resuspendiert und bei 10.000 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Wolfram Puder dreimal in 1.5ml sterilem H₂O gewaschen und in 1ml 50% (w/v) sterilem Glycerol resuspendiert. Die Transformationssuspension bestand aus 25µl Wolframsuspension, 5µl supercoiled Plasmid DNA (µg/µl), 25µl sterilem 2.5M CaCl₂ und 10µl 0.1M Spermidin. Diese Transformationssuspension wurde vorsichtig gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 35µl von dem Überstand verworfen und bis zur Transformation auf Eis gelagert. Der Beschuß erfolgte nach Anleitung der „*Pyscomitrella patens* methods“, Cove (1995).

Nach Beschuß wurden die Proben für zwei Tage unter den jeweiligen Bedingungen kultiviert und auf Selektivmedium mit den jeweiligen Antibiotika (G418 50µg/ml, Hygromycin 30µg/ml) überführt.

2.4.1. Einteilung des Stabilitätsgrades nach einer biolistischen Transformation



2.5. Bakterienstämme und Plasmide

2.5.1. Bakterienstämme

Als Bakterienstamm wurde aus *E. coli* der K12 Stamm und der XL1-Blue MRF (Bullock et al., 1987) Stamm verwendet.

2.5.2. Plasmide

Die fünf unterschiedlichen NPTII-Intron Konstrukte wurden von Ralph Jürgen Hörold während seiner Doktorarbeit konstruiert („Verwendung synthetischer Intronvektoren für Genexpressionsstudien in *Nicotiana tabacum* L.“(1995), AG Peter Meyer, Max-Planck-Institut, Universität zu Köln).

1) pT13d2:

Als Ausgangsvektor für die unterschiedlichen NPTII-Intron Konstrukte diente das Plasmid pT13d2 (R. Heinrichs, unveröffentlicht), seine Größe beträgt 3.789Kb.

Dieser von pBR322 (Bolivar et al., 1977) abgeleitete Vektor enthält ein vom Promotor des Nopalinsynthase-Gens (NOS) und der Polyadenylierungsregion des Octopinsynthase-Gens (OCS) aus *A. tumefaciens* kontrolliertes Tn5- NeomycinphosphotransferaseII-Gen (Beck et al., 1982).

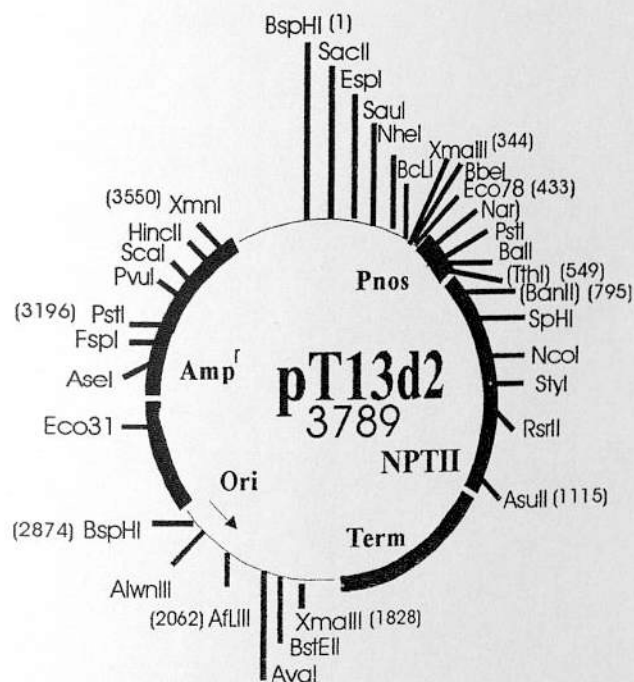


Abb.5 Plasmidkarte des NPTII-Intronkonstruktes pT13d2

2.) pINS 2:

Die Größe des Plasmids beträgt 3.885Kb. Im NPTII-Gen in Position 37/38 befindet sich ein 96bp großes artifizielles Intron.

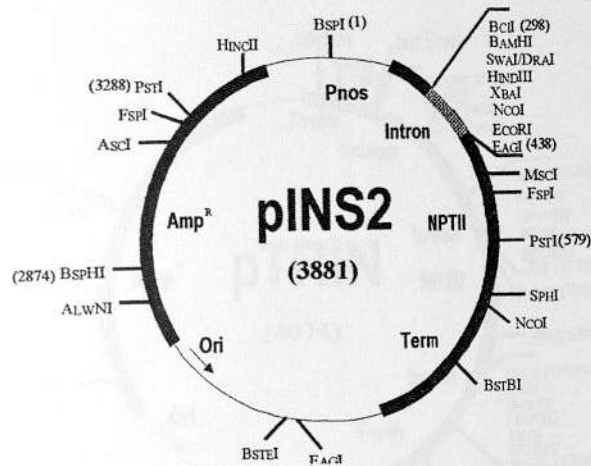


Abb.6 Plasmidkarte des NPTII-Intronkonstruktes pINS2

3.) pINS3:

Die Größe des Plasmids beträgt 3.885Kb. Im NPTII-Gen in Position 229/230 befindet sich ein 96bp großes artifizielles Intron.

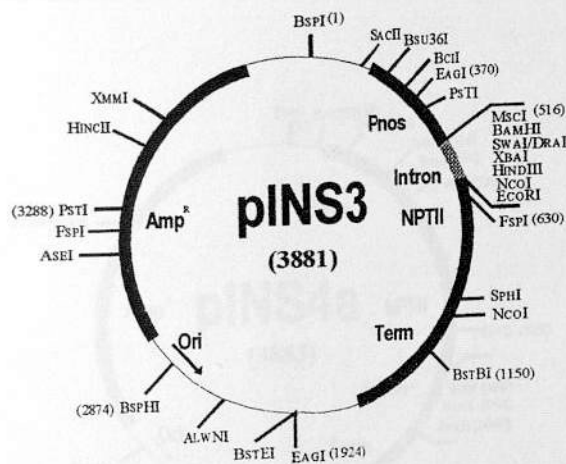


Abb.7 Plasmidkarte des NPTII-Intronkonstruktes pINS3

pTRIN:

Die Größe des Plasmids beträgt 4.074Kb. Im NPTII-Gen befindet sich an den Positionen 37/38, 229/230 und 622/623 jeweils ein 96bp großes artifizielles Intron.

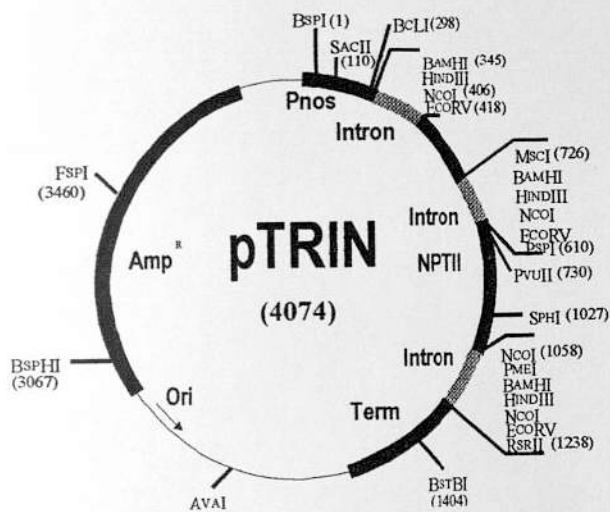


Abb.8 Plasmidkarte des NPTII-Intronkonstruktes pTRIN

5.) pINS4a:

Die Größe des Plasmids beträgt 3.885Kb. Im NPTII-Gen in Position 622/623 befindet sich ein 96bp großes artifizielles Intron.

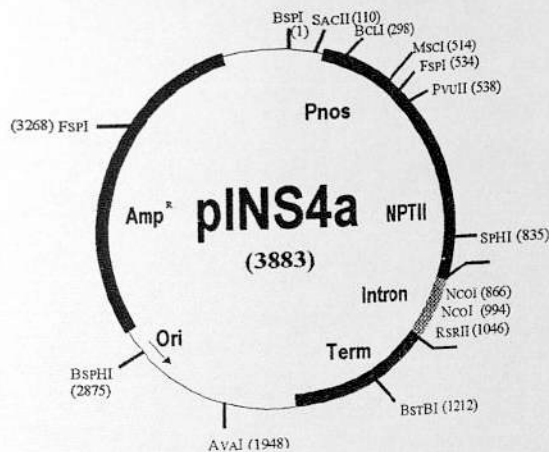


Abb.9 Plasmidkarte des NPTII-Intronkonstruktes pINS4a

Die im folgenden aufgeführten Plasmide wurden ebenfalls für die Transformation verwendet, wobei sie keine Intronkonstrukte beinhalten.

1.) pBI221:23 (Croy, 1993):

Dieser von pUC19 (Norrrander et al., 1983) abgeleitete Vektor weist eine Größe von 6.986Kb auf, wobei die Größe des Inserts 4.210Kb beträgt. Der Vektor enthält ein vom Promotor des CaMV 35S Promotor und aus *A. tumefaciens* kontrolliertes Tn5-NeomycinphosphotransferaseII-Gen (Beck et al., 1982) in Fusion mit dem Gus-Gen.

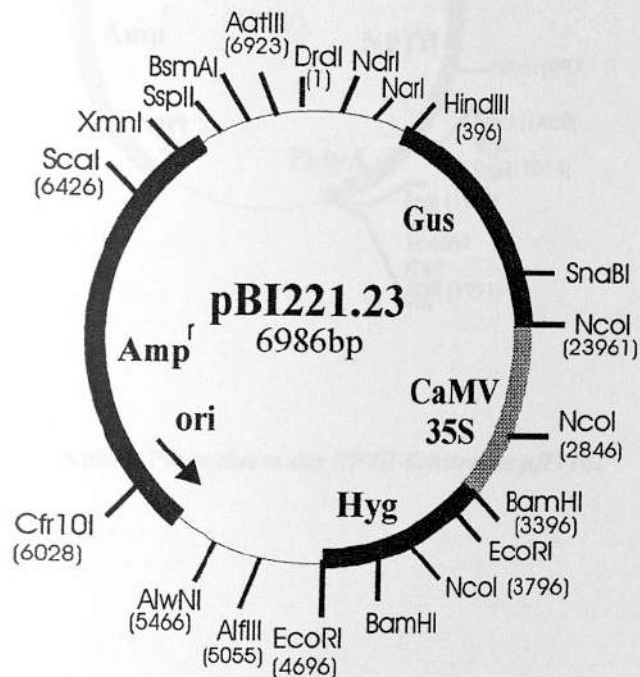


Abb.10 Plasmidkarte des NPTII-Konstruktes pBI221:23

- 2.) **pJIT161**: Dieser von pUC19 (Norrand et al., 1983) abgeleitete Vektor weist eine Größe von 4.210Kb auf, wobei die Größe des Inserts 1.434Kb beträgt. Der Vektor enthält ein vom Promotor des CaMV 35S Promotor und aus *A. tumefaciens* kontrolliertes Tn5-NeomycinphosphotransferaseII-Gen (Beck et al., 1982).

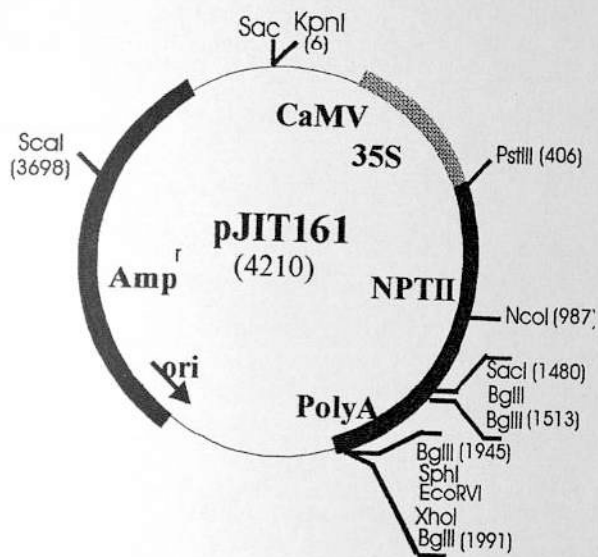


Abb.10 Plasmidkarte des NPTII-Konstruktes pJIT161

2.5.3. Plasmidisolierung

2.5.3.1. Minipräparation von Plasmiden

Zur Isolierung der Plasmide aus *E.coli* wurde die Methode nach Birnboim und Doly (1979), modifiziert nach Sambrook et al.(1989) angewendet. Die isolierten Plasmide wurden in 20µl TE (Sambrook et al., 1989) mit RNase (20µg/µl) aufgenommen, 15min bei 37°C inkubiert und bei 4°C gelagert.

2.5.3.2. Maxipräparation von Plasmiden

Ausgehend von größeren Mengen an Bakteriensuspension erfolgte eine Plasmidpräparation nach dem Protokoll der Firma Qiagen (Qiagen Plasmid Handbook, Max-Volmer-Str.4, 40724 Hilden, Germany) und der Firma Promega (Technical Bulletin, Wizard Maxipreps DNA purification system, 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399 USA). Diese Säulen enthalten einen Anionen-Austauscher-Harz, so das sehr reine DNA isoliert werden konnte.

2.6. Kultur von *E.coli*

Aus einer bei -70°C gelagerten Bakterienkryokultur wurden mittels einer Impföse Bakterien entnommen und auf LB-Platten (Sambrook et al., 1989) mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Nach einer Inkubation bei 37°C für 14-16 Stunden wurden die Platten bei 4°C gelagert und konnten bei Bedarf für 4-6 Wochen verwendet werden.

2.6.1. Übernachtskulturen

Von den Bakterienkulturen (2.5.1.3.) wurden einzelne Kolonien mittels Impföse entnommen und über Nacht unter ständigem Schütteln bei 37°C in 3ml LB-Medium (Sambrook et al., 1989) mit 50µg/ml Ampicillin kultiviert.

2.6.2. Kompetente Zellen

Die zur Transformation (Hanahan, 1985) nötigen kompetenten Bakterien des *E.coli* Stammes XL1-Blue MRF wurde nach der CaCl₂-Methode (Cohen et al., 1972) präpariert und in Aliquots bei -70°C gelagert.

Die für die Elektroporation benötigten kompetenten Zellen wurde nach der Anleitung des Herstellers „Procedure for High Efficiency Electroporation of *E.coli*, A: Preparation of cells“ durchgeführt. Für die Präparation der Zellen wurden in 400ml LB-Medium mit 50µg/ml Amp. 4ml Übernachtskultur (2.7.1.4.) kultiviert, die Zellen wuchsen bis sie eine OD₆₀₀ = 0.6 aufwiesen. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Eis wurden die Zellen in einem vorgekühltem Rotor für 15min. bei 4000 x g sedimentiert und das Pellet in 1l kaltem H₂O resuspendiert. Nach einer wiederholten Zentrifugation wurde das Pellet in 20ml 10%igen Glycerol aufgenommen und nochmals sedimentiert. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte in 2,5ml 10%igen Glycerol, so daß die Konzentration der Zellen 2×10^{10} Zellen/ml betrug. Die Aliquots wurden bei -70°C gelagert und bei Bedarf verwendet.

2.6.3. Kryokultur

Zur Herstellung von Kryokulturen wurden die Bakterien wie unter 2.5.1.4 beschrieben mit 100µg/ml Ampicillin inkubiert und am Morgen mit 3ml 50%igen LB / Glycerin (w/v) gemischt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.7. Histochemischer Gus-Test

Der histochemische Gus-Test (Jeffersen et al., 1984) erlaubt eine optische Identifizierung transgener Zellen. Dies ist möglich, weil das farblose Substrat der Reaktion in ein blau gefärbtes Produkt umgesetzt wird. Das Substrat wird X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl glucuronid) genannt. Das Gewebe wurde unter sterilen Bedingungen mit dem Färbepuffer (100µl 1M Natriumphosphat, 10µl 0.5M Potassiumferricyanid, 10µl Potassiumferrocyanid, 25µl X-Gluc Solution, (0,5mg in 25µl Dimethylformamid) überschichtet und bei 37°C ü.N. inkubiert.

2.8. Transformation durch Elektroporation in *E.coli* Zellen

Die Transformation durch Elektroporation in *E.coli* Zellen (Dower et al., 1988) bei der biologische Membranen durch das Anlegen eines elektrischen Feldes durchlässig gemacht werden, wurde ursprünglich entwickelt, um DNA-Fragmente in eukaryotische Zellen zu transformieren (Neumann et al., 1982; Potter et al., 1984; Frommet et al., 1985; Chu et al., 1987). Nach kurzer Zeit konnte man jedoch durch die Elektroporation DNA-Fragmente in *E.coli* (Dower et al., 1988; Taketo 1988) und in andere Bakterien (Chassy & Flickinger 1987; Harlander 1987; Somkuti & Steinberg 1987; Fiedler & Wirth 1988; Miller et al., 1988; Powell et al., 1988) transformieren. Die Effizienz dieser Transformationsart liegt bei 10^9 - 10^{10} Transformanten/µgDNA.



Abb.4: Darstellung des Elektroporationionsgerätes, womit die *E.coli* Zellen transformiert wurden (Easyject PLUS electropotator, Flowgen Instruments Ltd, UK)

Für die Elektroporation wurde vorerst eine Transformationssuspension präpariert (45µl kompetente Zellen (2.7.1.5.) mit 5µl Plasmid DNA, wobei die Konzentration der DNA bis zu 10pg betragen konnte) und in vorgekühlten Transformationsküvetten für 10min. auf Eis inkubiert. Das Elektroporationsgerät (Easyject PLUS electropotator, Flowgen Instruments Ltd, UK) wurde nach der Anleitung vom Hersteller (Procedure for High Efficiency Electrotransformation of *E.coli*; B) Electrotransformation and Plating) eingestellt und die Elektroporationsküvette in den dafür vorgesehenen abgeschirmten Raum gelegt. Eine Transformation erfolgte in 4-5sec. bei 12.5 kV / cm, die Voltzahl wurde auf 2500V mit einer Kapazität von 25µFD eingestellt.

Nach der Transformation wurden 950µl LB-Medium zu der Transformationssuspension pipettiert und 20min. bei 37°C inkubiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 2000 x g wurden 500µl vom Überstand dekantiert. Das Pellet wurde mit dem Restmedium gut durchmischt und die transformierten Zellen anschließend auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausgestrichen und bei 37°C ü.N. inkubiert.

2. 9. Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA (Dellaporta et al., 1983) wurden 6 Monate alte stabil transformierte Mooskulturen (bei -70°C gelagert) verwendet. Die Isolierung erfolgte nach der Methode von Dellaporta et al. (1983). Die Kulturen wurden mit flüssigem Stickstoff gemörsert, mit 15ml Extraktionspuffer (100mM Tris pH 8, 50mM EDTA pH 8, 500mM NaCl, 10mM Mercaptoethanol) und 1ml 20 % SDS kräftig durchmischt und 10min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 5ml 5M Kaliumacetat wurde ebenfalls kräftig durchmischt und 20min bei 0°C gelagert. Anschließend wurde die Lösung bei 25000 x g für 20min zentrifugiert.

Der Überstand wurde in einem 30ml Zentrifugenröhrchen, welches 10ml Isopropanol enthielt, steril filtriert (microcloth Filter, Calbiochem). Nach 30-minütiger Inkubation bei -20°C folgte die Zentrifugation bei 20000 x g für 15min. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 700µl TE-Puffer (50mM Tris, 10mM EDTA pH 8) gelöst, in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und für 10min zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und anschließend wurde eine Phenol/Chloroform Behandlung durchgeführt. Es folgte eine RNase-Behandlung und eine Ethanol-Fällung, wobei letztere durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat und 2.5 Volumen abs. Ethanol durchgeführt wurde. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und mit 100µl TE resuspendiert.

Für die Elektroporation wurde vorerst eine Transformationssuspension präpariert (45µl kompetente Zellen (2.7.1.5.) mit 5µl Plasmid DNA, wobei die Konzentration der DNA bis zu 10pg betragen konnte) und in vorgekühlten Transformationsküvetten für 10min. auf Eis inkubiert. Das Elektroporationsgerät (Easyject PLUS electropotator, Flowgen Instruments Ltd, UK) wurde nach der Anleitung vom Hersteller (Procedure for High Efficiency Electrotransformation of *E.coli*; B) Electrotransformation and Plating) eingestellt und die Elektroporationsküvette in den dafür vorgesehenen abgeschirmten Raum gelegt. Eine Transformation erfolgte in 4-5sec. bei 12.5 kV / cm, die Voltzahl wurde auf 2500V mit einer Kapazität von 25µFD eingestellt.

Nach der Transformation wurden 950µl LB-Medium zu der Transformationssuspension pipettiert und 20min. bei 37°C inkubiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 2000 x g wurden 500µl vom Überstand dekantiert. Das Pellet wurde mit dem Restmedium gut durchmischt und die transformierten Zellen anschließend auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausgestrichen und bei 37°C ü.N. inkubiert.

2. 9. Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA (Dellaporta et al., 1983) wurden 6 Monate alte stabil transformierte Mooskulturen (bei -70°C gelagert) verwendet. Die Isolierung erfolgte nach der Methode von Dellaporta et al. (1983). Die Kulturen wurden mit flüssigem Stickstoff gemörsernt, mit 15ml Extraktionspuffer (100mM Tris pH 8, 50mM EDTA pH 8, 500mM NaCl, 10mM Mercaptoethanol) und 1ml 20 % SDS kräftig durchmischt und 10min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 5ml 5M Kaliumacetat wurde ebenfalls kräftig durchmischt und 20min bei 0°C gelagert. Anschließend wurde die Lösung bei 25000 x g für 20min zentrifugiert.

Der Überstand wurde in einem 30ml Zentrifugenröhrchen, welches 10ml Isopropanol enthielt, steril filtriert (mikrocloth Filter, Calbiochem). Nach 30-minütiger Inkubation bei -20°C folgte die Zentrifugation bei 20000 x g für 15min. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 700µl TE-Puffer (50mM Tris, 10mM EDTA pH 8) gelöst, in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und für 10min zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und anschließend wurde eine Phenol/Chloroform Behandlung durchgeführt. Es folgte eine RNase-Behandlung und eine Ethanol-Fällung, wobei letztere durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat und 2.5 Volumen abs. Ethanol durchgeführt wurde. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und mit 100µl TE resuspendiert.

2.10. Restriktionsverdau der DNA mit Endonukleasen

Für den Restriktionsverdau wurden die jeweiligen Endonukleasen und die dazu empfohlenen Puffer der unter 2.4 beschriebenen Firmen verwendet. Die Konzentration des Enzyms betrug 6U/ μ g DNA. Der Ansatz wurde mindestens 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 10 x Stoppuffer (Sambrook et al., 1989) und 20-minütiger Inkubation bei 65°C erfolgte ein Abstoppen der Reaktion. Das Abstoppen des Enzyms BamHI wurde durch eine DNA Fällung vollzogen, da das Enzym eine Hitzeresistenz aufweist. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden anschließend durch eine Agarose-Gelelektrophorese (2.5.4) voneinander getrennt.

2.11. Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden in einem 1- bzw. 0.7%igen (w/v) Agarosegel elektrophoretisch voneinander getrennt. Je nach Gelgröße erfolgte der Gellauf bei einer Spannung von 70-90 V. Hierfür wurden sowohl TBE- (Sambrook et al., 1989) als auch TAC-Puffer (Sambrook et al., 1989) verwendet.

2.11.1. Elution von DNA Fragmenten aus dem Agarosegel

Zur Elution von bestimmten DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde bei der elektrophoretischen Auftrennung das Agarosegel mit 1x TAC-Puffer angefertigt. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente mit einem abgeflammtten Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten, die Gelstücke gewogen und in ein 1.5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der Fragmente erfolgte nach der „jet-Sorb“ Anleitung (Genomed, Bad Oeynhausen). Anschließend wurden die Fragmente durch erneute gelelektrophoretische Auftrennung quantifiziert.

2.12. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.12.1. Photometrische Messung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wäßriger Lösung erfolgte mit einem Spektralphotometer (Beckman DU-20). Die Konzentration wurde bei 260nm gemessen. Dabei wurde davon ausgegangen, daß bei einer Wellenlänge von 260nm eine Extinktion von 1 einer DNA Konzentration von 50 μ g/ml entspricht (Sambrook et al., 1989). Die Quotienten $OD_{260/280}$ erlaubten eine Aussage über eine etwaige Proteinverunreinigung.

Das Verhältnis von OD_{260nm} zu OD_{280nm} sollte bei Nukleinsäurelösungen zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Ist das Verhältnis kleiner als 1.8, so könnte eine Verunreinigung mit Proteinen vorliegen. Liegt es bei über 2, so ist eine Verunreinigung mit Phenol anzunehmen.

2.12.2. Konzentrationsbestimmung im Agarosegel

Zur Konzentrationsbestimmung geringer DNA-Mengen eignet sich das Auftragen von DNA auf ein ethidiumbromidhaltiges Agarosegel. Als Standard-DNA-Banden dienten definierte Mengen (100ng, 200ng, und 500ng) linearisierter Plasmid DNA. Die DNA unbekannter Menge konnte aufgrund ihrer Einlagerung von Ethidiumbromid mit der Standard-DNA verglichen und die Menge so ermittelt werden.

2.13. Eingesetzte Gensonden für die Southern-Hybridisierung

Es wurde eine 1100bp große Sonde aus dem Plasmid pBI221.23 für die Southern Hybridisation verwendet, wobei das Fragment für das Hygromycin Gen kodierte. Für die Hybridisierung der genomischen DNA wurde das Plasmid pBI221.23 – linearisiert mit dem Restriktionsenzym *HindIII* - verwendet.

2.13.1. Gensonden

Ein Restriktionsverdau (2.5.3) mit dem Enzym *EcoRI* ermöglichte die Isolierung des gewünschten 1100bp-Fragmentes aus dem Plasmid pBI221.23. Das Fragment wurde gelelektrophoretisch (2.5.4) aufgetrennt, aus dem Gel mit „jet-Sorb“ (Genomed, Bad Oeynhausen) eluiert und anschließend durch erneute gelelektrophoretische Auftrennung quantifiziert.

2.13.2. Markierung der Gensonden

Die isolierten Fragmente wurden mittels des DIG DNA Labeling Kits (Boehringer Mannheim) mit Digoxigenin markiert. Die Markierungszeit betrug über 20 Stunden bei 37°C. Eine Quantifizierung der markierten DNA erfolgte laut Angaben des Herstellers, 50ng der markierten Sonde wurden für 10min bei 95°C im Wasserbad denaturiert und in 68°C temperierte Prähybridisierungslösung gegeben. Diese Lösung wurde entweder direkt zur Hybridisierung eingesetzt oder bis zur Anwendung bei -20°C gelagert.

2.14. Southern-Blot und Southern-Hybridisierung

Für den Southern-Blot und die Hybridisierung wurden die unten aufgeführten Lösungen verwendet.

Denaturierungslösung:	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl
Neutralisierungslösung:	1.5 M NaCl 0.5 M Tris pH 7.0
20 x SSC:	3 M NaCl 0.3 M Na-citrat pH 7.0
Dig-Puffer 1:	0.1M Maleinsäure 0.15M NaCl pH 7.5
Dig-Puffer 2:	2.5% Blockierungslösung in Dig-Puffer 1
Dig-Puffer 3:	0.1M Tris 0.1M NaCl pH 7.5
Dig-Waschpuffer:	0.3% (v/v) Tween-20 (Roth Karlsruhe) in Dig-Puffer 1
Anti-Dig-Lösung:	75mU/ml Anti-Dig-Ap-Konjugat (Boeringer Mannheim) in Dig-Puffer 2
CSPD-Substrat-Lösung:	1:100 Verdünnung der CSPD-Vorratslösung in 25mM (Boeringer, Mannheim) Dig-Puffer 3
Prähybridisierungslösung:	5 x SSC in Dig-Puffer 2 0.1 % (w/v) N-Laurylsarcosine 0.1 % (w/v) SDS 50µg/ml Hefe-RNA (Boeringer, Mannheim)
Hybridisierungslösung:	Markierte Gensonde in Prähybridisierungslösung

Die Plasmide wurden durch gewünschte Restriktionsendonukleasen (2.5.3) gespalten und gelelektrophoretisch (2.5.4) aufgetrennt. Das Agarosegel wurde kurz in H₂O gespült, 2 x 10min in 0.25M HCl unter Bewegung inkubiert, damit auch große Fragmente denaturiert werden, danach wurde das Agarosegel nochmal 3 x in H₂O gespült und 45min in Denaturierungslösung unter Bewegung inkubiert. Anschließend wurde das Agarosegel mit H₂O gespült und 45min unter Bewegung in Neutralisationslösung belassen.

Die Plasmide wurden durch Kapillarblot über Nacht mit 10 x SSC (Sambrook et al., 1989) auf eine ungeladene Nylon-Membran (Qiagen) transferiert. Daraufhin wurde die DNA durch UV-Licht auf der Membran fixiert (Stratalinker, 1200mJ, Stratagene Heidelberg) und mit 2 x SSC gewaschen. Die Membran wurde in vorgewärmte Hybridisierungsgefäße gegeben und 3 Stunden bei 68°C Ofen in der Prähybridisierungslösung inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde aufgefangen und zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurde die Membran ü.N. im Hybridisierungsschrank bei 68°C in der Hybridisierungslösung die zuvor 10min bei 95°C denaturiert wurde, inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Hybridisierungslösung in einem Falcon Röhrchen aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurde die Membran mit 2 x SSC / 0.1%SDS (w/v), 2 x 5min bei RT gewaschen. Der nächste Waschschrift folgte mit 0.2 x SSC / 0.1% SDS (w/v) 2 x 15min bei 68°C im Hybridisierungsschrank.

Für die Detektion wurde die Membran 5min in Dig-Waschpuffer bei RT gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Dig-Puffer 2, dann in der Antikörperlösung für jeweils 30min bei RT inkubiert. Die Waschschriffe erfolgten jeweils 4 x 30min mit dem Dig-Waschpuffer bei RT. Nach einer 5-minütigen Inkubation der Membran in Dig-Puffer 3 wurde die Membran in einem mit CSPD-Lösung benetzten Folienschlauch eingeschweißt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT und 15-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte eine die Membran in einer Filmkassette mit Exposition des Hyperfilms ECL (Amersham, Braunschweig) für 3-5min.

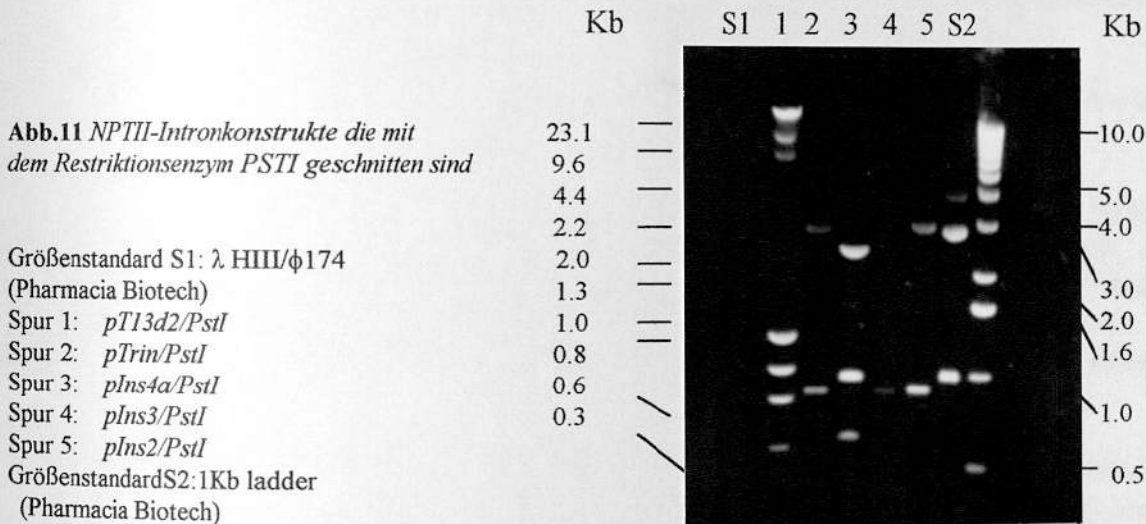
3. Ergebnisse

3.1 Überprüfung der Plasmide mit den NPTII-Intronkonstrukten

Die Überprüfung der Plasmide mit den Intronkonstrukten erfolgte durch eine quantitative Bestimmung in einem 0.7%igen Agarosegel (2.11.).

3.1.1. Restriktion der Plasmide mit dem Restriktionsenzym *PstI*

Eine Restriktionsanalyse (2.10.) erfolgte mit dem Restriktionsenzym *PstI*, worauf eine anschließende gelelektrophoretische Auftrennung (2.11.) der Fragmente durchgeführt wurde.



Das Konstrukt *pT13d2* wurde durch das Restriktionsenzym *PstI* in zwei unterschiedliche Fragmente unterteilt, die eine Größe von 2.9Kb und 0.9Kb aufwiesen. Das NPTII-Intronkonstrukt *pTrin* wurde durch das Restriktionsenzym *PstI* in drei Fragmente mit den Größen 0.7Kb, 1.0Kb und 2.3Kb unterteilt. Durch eine Restriktion des Konstruktes *pINS4a* und *pINS2* entstanden zwei Fragmente mit folgenden Größen: 2.8Kb und 1.0Kb. Das Intronkonstrukt *pINS3* wies hingegen zwei Fragmente mit einer Länge von 3.0Kb und 0.8Kb auf.

Das Ergebnis dieser Restriktionsanalyse zeigte, daß die NPTII-Intronkonstrukte ihren angegebenen Größen entsprachen und somit für die biolistische Transformation verwendet werden können.

3.2. Bei der biolistischen Transformation erhaltene Transformationsraten mit den NPTII-Intronkonstrukten und Darstellung der Mooskulturen

Die biolistische Transformation erfolgte (2.4.) mit sechs verschiedenen Plasmiden, wobei das Plasmid *pJIT161* zusätzlich noch als Positivkontrolle diente, da das Plasmid schon über längere Zeit als Transformationskonstrukt mit sehr guten Ergebnissen verwendet wurde.

Die dazu verwendeten Pflanzen waren aus der Linie *pabA3*, dieses sind durch MNNG induzierte Mutanten, die durch Ashton und Cove, (1977) erzeugt wurden. Die Plasmid-DNA wurde als zirkuläre Form für die Transformation verwendet. Um eine Kontrolle zu haben, inwieweit die Konzentration des Plasmides eine Rolle spielt, fand die Transformation mit zwei unterschiedlichen Ansätzen statt, wobei die Konzentration der Plasmid-DNA sich in der Transformationssuspension unterschied ($1\mu\text{g}$ und $1,5\mu\text{g}$). Es folgten zwei aufeinander folgende Beschüsse.

Die Pflanzen wurden nach zwei Tagen mit einem Homogenisator (Abb.1 und Abb.2) in 10ml sterilem H_2O zerkleinert und mit jeweils 3ml auf Selektivmedium transferiert.

Nach 14 Tagen Selektionszeit wurden alle Regeneranten optisch identifiziert und auf frisches Selektivmedium überführt. Die stabil transformierten Pflanzen wuchsen sehr schnell, die nichtstabil transformierten Pflanzen jedoch sehr langsam, wobei die transienten Pflanzen die Kultur auf Selektivmedium nicht überlebten. Eine Subkultur wurde immer jeweils nach 14 Tagen vorgenommen, wobei das Medium im Wechsel mit und ohne Antibiotika verwendet wurde (3.3).

Die Errechnung der bei der biolistischen Transformation erhaltenen Transformationsraten wurde nach einem Schema der Standard Leeds Methoden (*Physcomitrella patens* methods, Cove, 1995) durchgeführt. Nach dem Beschuß und der Homogenisierung der Pflanzen wurde die Zahl der Regeneranten festgestellt. Diese Zahl entsprach 100%, d.h. alle Regenerante (transiente, nichtstabile und stabile) wurden hier einbezogen. Die transienten Transformanten überlebten nicht die erste selektive Subkultur. Die nichtstabilen Transformanten hingegen wuchsen langsam, aber überlebten das Selektivmedium. Sobald sie in nichtselektives Medium überführt wurden, regenerierten sie nicht. Die stabilen Transformanten wuchsen sehr schnell und überlebten den Transfer vom selektiven auf nichtselektives Medium. In der Tab.2 und Tab.3 sind die Transformationsraten dargestellt.

Verwendete Plasmide	Regenerante nach 14 Tagen auf BCD/G418	Regenerante nach 14 Tagen auf BCD/G418		
		Stabile	Nichtstabile	Transiente
pJIT161 (1µg)	461	18 = 3.9%	203 = 44%	240 = 52.1%
pT13d2 (1µg)	94	0	15 = 16%	79 = 84%
pINS3 (1µg)	100	0	25 = 25%	75 = 75%
pINS2 (1µg)	106	0	23 = 21.6%	83 = 78.3%
pTRIN (1µg)	62	0	8 = 12.9%	54 = 87%
pINS4a (1µg)	92	0	19 = 20.6%	73 = 79.3%

Tab.2 Verwendete NPTII-Intronkonstrukte pT13d2, pTRIN, pINS4a, pINS3, pINS2, pJIT161 und Anzahl der Regeneranten, wobei die Konzentration der verwendeten DNA 1µg betrug

Verwendete Plasmide	Regenerante nach 14 Tagen auf BCD/G418	Regenerante nach 14 Tagen auf BCD/G418		
		Stabile	Nichtstabile	Transiente
pJIT161 (1.5µg)	469	26 = 5.5%	363 = 77.3%	80 = 17.1%
pT13d2 (1.5µg)	122	0	59 = 48.3%	63 = 51.6%
pINS3 (1.5µg)	104	0	37 = 35.5%	67 = 64.4%
pINS2 (1.5µg)	113	0	35 = 30.9%	78 = 69%
pTRIN (1.5µg)	108	0	43 = 39.8%	65 = 60.1%
pINS4a (1.5µg)	120	0	48 = 40%	72 = 60%

Tab.3 Verwendete NPTII-Intronkonstrukte pT13d2, pTRIN, pINS4a, pINS3, pINS2, pJIT161 und Anzahl der Regeneranten, wobei die Konzentration der verwendeten DNA 1.5µg betrug

Wie an der Tab.3 und Tab.4 zu sehen ist, wurden keine stabilen Transformanten durch die NPTII-Intronkonstrukte beobachtet. Die Transformation wurde zweimal mit unterschiedlicher DNA-Konzentration durchgeführt. Die Tab.3 weist auf die Ergebnisse der Transformation mit der niedrigen DNA-Konzentration auf (1µg). Durch das Kontrollkonstrukt *PT13d2* - welches kein Intron enthält - wurden 16% nichtstabile und 84% transiente Transformanten erhalten. Bei den restlichen NPTII-Intronkonstrukten wurden ebenfalls um 20% nichtstabile und 80% transiente Transformanten beobachtet. Mit dem *pTRIN*-Konstrukt war die Zahl der nichtstabilen Transformanten außergewöhnlich niedrig, sie lag bei 12.9%, das macht ungefähr 50% der allgemeinen nichtstabilen Transformationsrate aus.

In der Tab.4 (DNA-Konzentration 1,5µg) näherte sich der prozentuale Wert von dem *pTRIN*-Konstrukt den restlichen NPTII-Intronkonstrukten. Hier ist eine allgemeine Erhöhung der nichtstabilen Transformanten zu beobachten, welches um die 40% variiert. Der prozentuale Wert der transienten Transformanten lag bei 60%.

Das einzige Konstrukt, mit welchem stabile Transformanten beobachtet wurden, war das *pJIT161*-Konstrukt. Dieses diente als zusätzliches Kontrollplasmid (enthält kein Intron). Auch hier ist eine Erhöhung der stabilen- und nichtstabilen Transformanten mit der Erhöhung der DNA-Konzentration zu beobachten. Der prozentuale Wert bei den stabilen Transformanten stieg mit der DNA-Konzentration von 3.9% auf 5.5%. Bei den nichtstabilen Transformanten stieg der prozentuale Wert von 44% auf 77.3%. Im Gegensatz zu den transienten Transformanten fiel der prozentuale Wert von 52.1 auf 17.1%.

Die unten dargestellten Mooskulturen wurden nach der biolistischen Transformation (2.4.) durch die NPTII-Intronkonstrukte transformiert und wie unter 3.3.1. beschrieben selektiert.

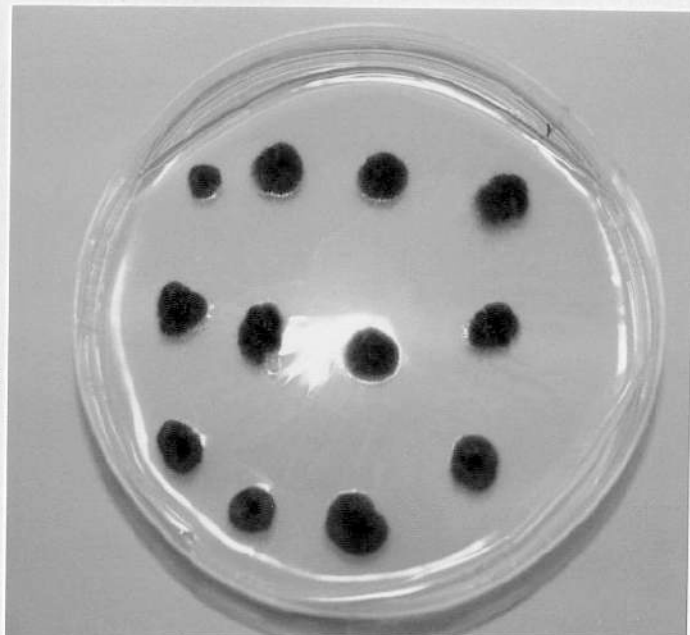


Abb.12 Durch die biolistische Transformation entstandene stabil transformierte Pflanzen mit dem Konstrukt *pJIT161* auf G418

Abb.13 Durch die biolistische Transformation entstandene nichtstabil und transient transformierte Pflanzen mit dem Konstrukt *pINS4a* auf G418

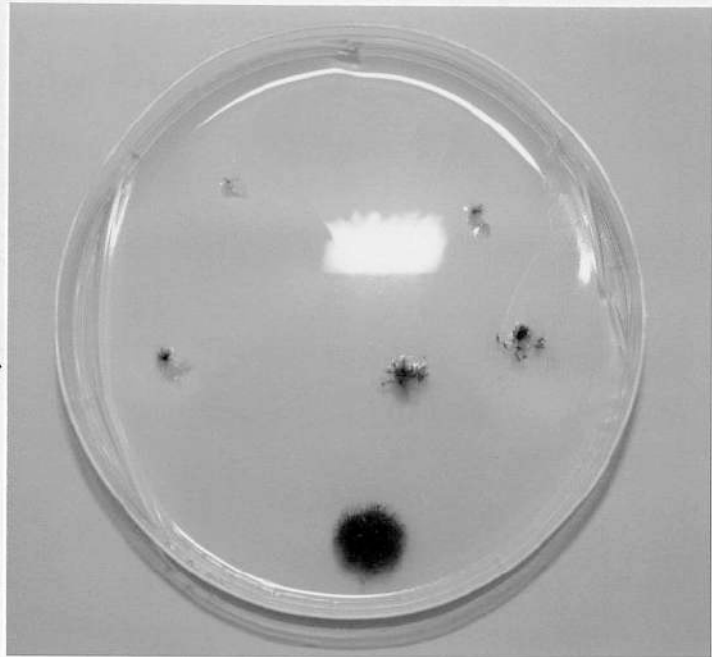


Abb.14 Die durch die biolistische Transformation entstandene stabil transformierten Pflanzen mit dem Konstrukt *pJIT161* auf G418

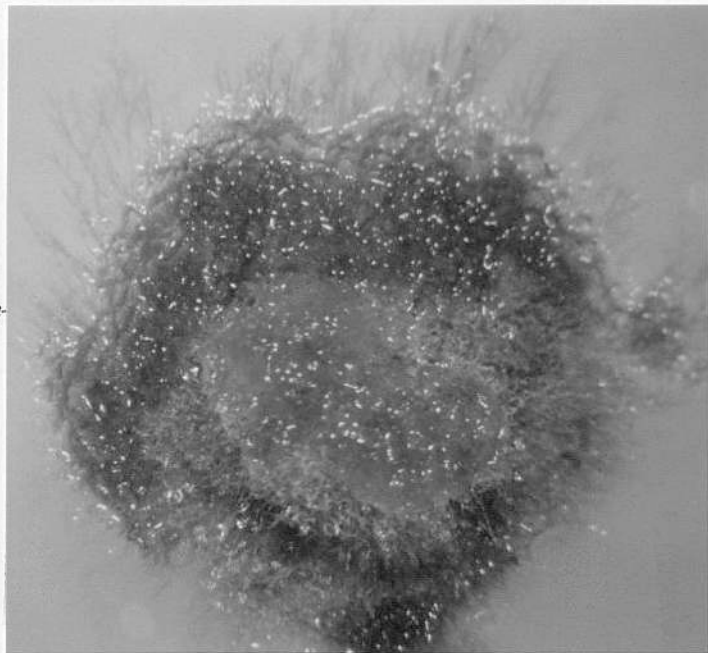


Abb.13 Durch die biolistische Transformation entstandene nichtstabil und transient transformierte Pflanzen mit dem Konstrukt pINS4a auf G418

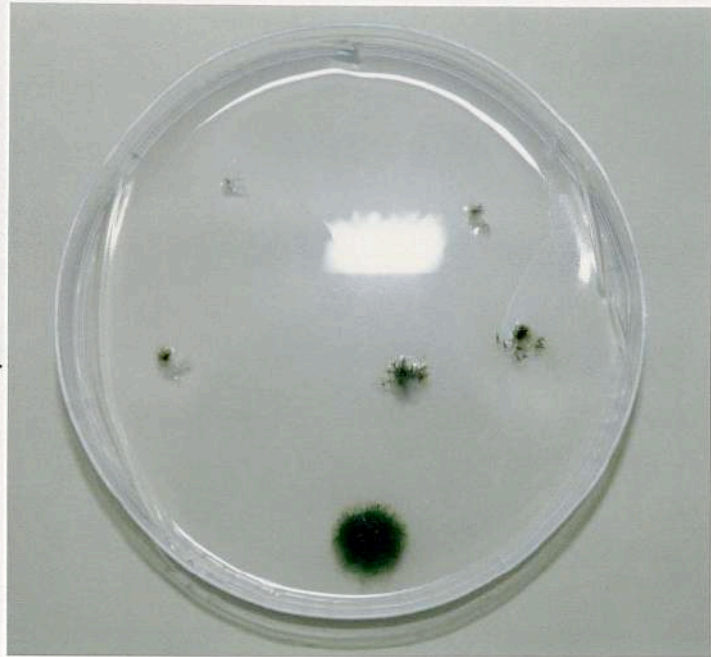


Abb.14 Die durch die biolistische Transformation entstandene stabil transformierten Pflanzen mit dem Konstrukt pJIT161 auf G418

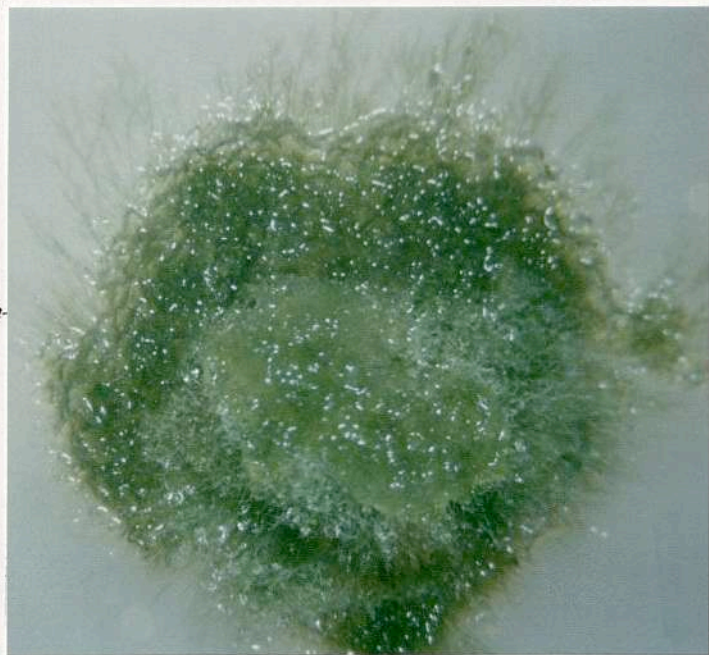


Abb.15 Durch die biolistische Transformation entstandene nicht stabil transformierte Pflanze mit dem Konstrukt *pINS2* auf G418

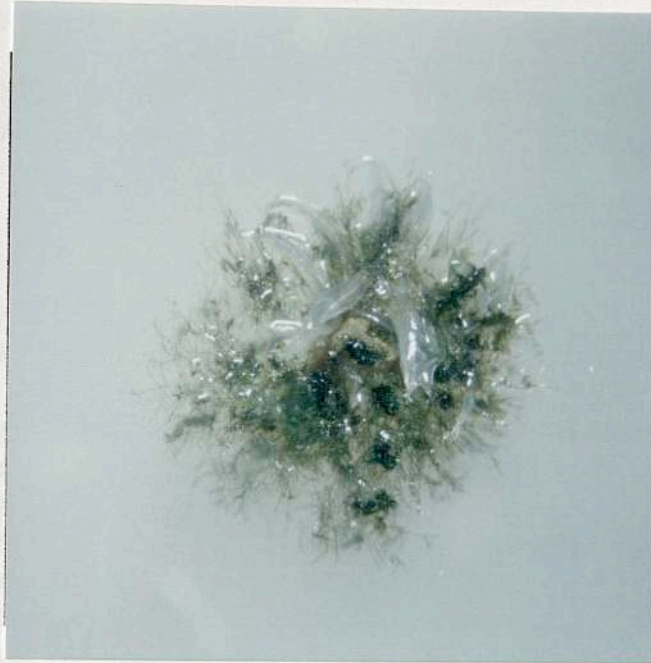


Abb.16 Durch die biolistische Transformation entstandene transient transformierte Pflanzen mit dem Konstrukt *pINS2* auf G418



3.3. Überprüfung der stabilen Transformanten

Um eine Überprüfung der stabil transformierten Pflanzen durchführen zu können, wurden die stabil transformierten Pflanzen einem histochemischen Test (2.7.) unterzogen.

3.3.1. Histochemischer Gus-Test

Der histochemische Test (2.7.) erfolgte nach Jeffersen et al. (1984). Dieser Test erlaubte eine optische Identifizierung der transgenen Pflanzen, weil das Substrat durch das Gus-Enzym in ein blau gefärbtes Produkt umgesetzt wird. Alle transgenen Pflanzen können durch die Farbänderung identifiziert werden d.h. auch die nichtstabilen Transformanten, da alle Zellen, die das Gus-Gen beinhalten, sich verfärben. Die Mooskulturen zeigen demnach nach mehrmaliger Subkultur in Selektivmedium auch eine Verfärbung. Aber sobald die nichtstabil transformierten Mooskulturen auf nichtselektives Medium transferiert werden, verlieren sie ihr Plasmid und eine Farbänderung kann nicht identifiziert werden. Dieser histochemische Test erlaubt eine zusätzliche Bestätigung der stabilen Transformanten, denn nach mehrmaligem Transfer von Selektiv- auf Nichtselektivmedium und umgekehrt überleben hauptsächlich nur stabil transformierte Mooskulturen.

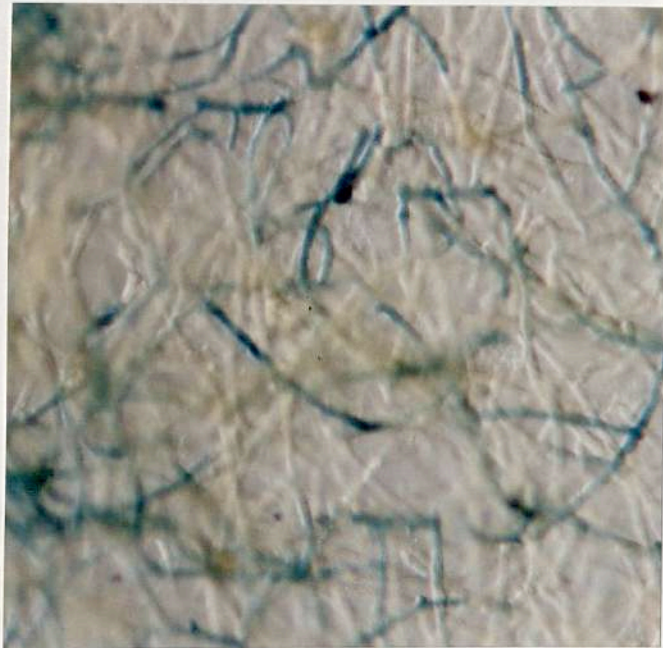


Abb.17 An der stabil transformierten Pflanze *Nar/pBI221:23* durchgeführter histochemischer Test

3.4. DNA-Isolierung der stabil transformierten Pflanzen Nar/pBI221:23 und Bar/pBI221:23

Durch die biolistische Transformation wurden sehr viele stabile transgene Mooskulturen durch die Technische Assistentin erzeugt. Um eine genetische Analyse durchführen zu können, wurde die DNA der stabil transformierten Mooskulturen - die durch das Plasmid *pBI221:23* transformiert wurden - isoliert.

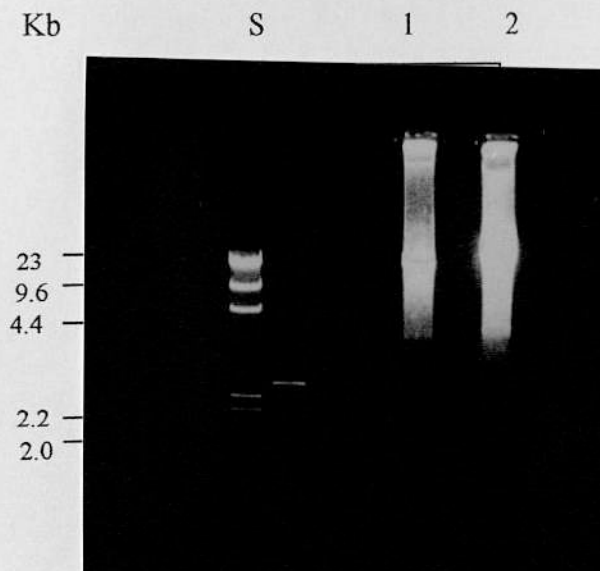
Nachdem sich die stabil transformierten Pflanzen durch den histochemischen Test bestätigten, wurde die DNA der Pflanzen nach Stephan et al. (1983) isoliert (2.9.), um die stabil transformierten Pflanzen näher untersuchen zu können. Zur DNA Isolierung wurden 0,5-0,75g Pflanzen verwendet und die Ausbeute lag bei 50µg.

Abb.18 Darstellung eines 0.75%igen Agarose-Gels mit der genomischen DNA aus den stabil transformierten Pflanzen Nar/pBI221:23 und Bar/pBI221:23 in nicht restringierter Form

Größenstandard S: λ /HindIII

Spur 1: Nar/pBI221:23

Spur 2: Bar/pBI221:23



3.4.1. Charakterisierung der extrachromosomalen Fragmente (Plasmide) in der unrestringierten genomischen DNA

Nachdem die genomische DNA der stabil transformierten Pflanzen isoliert (3.4.) wurde, um eine qualitative und quantitative Bestimmung im 0.7%igen Agarosegel zu demonstrieren, wurden in der Höhe von 4Kb und 2Kb extrachromosomale Fragmente detektiert (Abb.18).

3.4.2. Southern-Analyse der unrestringierten genomischen DNA

Zur näheren Untersuchung dieser extrachromosomalen Fragmente wurde ein Southern-Blot (2.6.7.) der genomischen DNA in unrestringierter Form durchgeführt. Für die Hybridisierung wurde das Plasmid pBI221:23 in linearer Form - geschnitten mit dem Enzym *HindIII* - verwendet. Der Southern-Blot (Abb.19) wies eine Hybridisierung bei der Pflanze Bar/pBI221:23 (Spur1) genau in der Höhe der extrachromosomalen Banden auf. In der Spur2 ist eine leichte Hybridisierung zu beobachten, möglicherweise war die aufgetragene DNA zu gering. Dieses bestätigte die Hypothese, daß es sich hier um das ursprüngliche Plasmid handle, womit die Mooskulturen transformiert wurden.

Die Benennung der extrachromosomalen Fragmente erfolgte nach der Pflanze, nach dem Plasmid mit welchem die Transformation durchgeführt wurde und nach der Größe des Fragmentes, z.B.Bar/pBI221:23/4Kb.

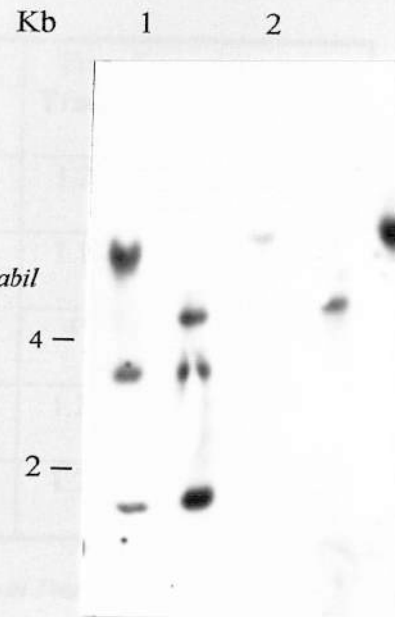


Abb.19 Darstellung eines Southern-Blots mit der genomischen DNA aus den stabil transformierten Pflanzen Nar/pBI221:23 und Bar/pBI221:23, nicht restringiert.

Spur 1: Ba/pBI221:23
Spur 2: Nar/pBI221:23

3.4.2.1. Elution der extrachromosomalen Fragmente (Plasmide) aus dem Agarosegel

Um die extrachromosomalen Fragmente genau charakterisieren zu können, wurden die Fragmente aus dem Agarosegel eluiert. Zur Quantifizierung wurden die eluierten Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es konnten keine Banden sichtbar gemacht werden, da die DNA-Menge möglicherweise zu gering war. Daher wurde die Entscheidung getroffen, eine Transformation von *E.coli* durch Elektroporation durchzuführen, um die DNA-Menge zu erhöhen.

3.4.2.2. Transformation der extrachromosomalen Fragmente (Plasmide) in *E.coli* durch Elektroporation

Zur Elektroporation wurde jeweils die Gesamtmenge der DNA verwendet, welches aus dem Agarosegel eluiert wurde (Bar/pBI221:23/4kb, Bar/pBI221:23/2kb, Nar/pBI221:23/4kb, Nar/pBI221:23/2kb), wobei das Endvolumen 5µl betrug. Zur Transformationssuspension wurde somit 45µl kompetente Zellen und 5µl Plasmid DNA präpariert. Neben diesen DNA-Fragmenten zur Transformation wurde als Kontrolle das Plasmid *pBI221:23* mit unterschiedlichen Konzentrationen (1µg, 500ng, 100ng, 500pg, 100pg) zur Abschätzung der verwendeten DNA-Menge präpariert. Nach Ausplattierung (jeweils 100µl und 400µl) der transformierten Zellen auf Selektivmedium (LB/Amp.) und einer Inkubation ü.N. bei 37°C sahen die Transformationsraten folgendermaßen aus:

3.4.2.3. Erhaltene Transformationsraten durch Elektroporation :

	Erhaltene Kolonien	Verwendete DNA	Transformationsraten Transformanten/µgDNA
pBI221:23	$\phi = 1200 \text{ K}$	1ng DNA	$1.2 \cdot 10^6 \text{ Transf./}\mu\text{gDNA}$
Bar/pBI221:23/4kb	$\phi = 11 \text{ K}$	10pg DNA	$1.1 \cdot 10^6 \text{ Transf./}\mu\text{gDNA}$
Bar/pBI221:23/2kb	$\phi = 7 \text{ K}$	10pg DNA	$4 \cdot 10^5 \text{ Transf./}\mu\text{gDNA}$
Nar/pBI221:23/4kb	$\phi = 8 \text{ K}$	10pg DNA	$1.2 \cdot 10^5 \text{ Transf./}\mu\text{gDNA}$
Nar/pBI221:23/4kb	$\phi = 6 \text{ K}$	10pg DNA	$1.2 \cdot 10^5 \text{ Transf./}\mu\text{gDNA}$

Tab.4 Darstellung der erhaltenen Transformationsraten durch Elektroporation in Transformanten/µgDNA

3.4.2.4. Plasmid-Isolierung aus der Übernachtskultur

Nachdem durch die Elektroporation mit den eluierten extrachromosomalen Fragmenten aus der unrestringierten genomischen DNA Kolonien auf Selektivmedium wuchsen, wurden diese in Übernachtskulturen überführt, woraus die Plasmide isoliert wurden.

3.4.2.5. Restriktionsanalyse der extrachromosomalen Fragmente

Um die extrachromosomalen Fragmente genauer charakterisieren zu können, wurden sie mit den folgenden Restriktionsenzymen geschnitten. Sollte es sich bei der Restriktion um das Plasmid handeln, welches ursprünglich in die NTG-Mutanten Nar und Bar transformiert wurde, so müßten nach einer Restriktion mit den Enzymen *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *NcoI* und *SnaBI* folgende Fragmente entstehen;

***EcoRI*:** Durch diese Endonuklease sollten zwei Fragmente entstehen, wobei ein Fragment 1Kb und das andere 6Kb groß sein sollte.

***HindIII*:** Durch dieses Enzym sollte das Plasmid linearisiert werden.

***BamHI*:** Durch diese Endonuklease sollte das Plasmid wie bei der Endonuklease *EcoRI* zwei Fragmente von 1Kb und 6Kb aufweisen.

***NcoI*:** Durch dieses Enzym sollte das Plasmid zwei Fragmente nach der angegebenen Restriktionskarte mit den Größen 0.6Kb und 6.4Kb aufweisen.

***NcoI/HindIII*:** Mit diesen beiden Enzymen - einem Doppelverdau - sollten nach der Restriktionskarte des Plasmides drei Fragmente mit den Größen 4.35Kb, 2.0Kb und 0.65Kb entstehen.

***SnaBI*:** Eine Restriktion mit der Endonuklease wies ein linearisiertes Fragment mit einer Größe von 7Kb auf, wobei die Schnittstelle sich im Gus-Gen befindet.

Nach einer Restriktion des Ausgangsplasmids mit der Endonuklease *NcoI*, wurden im Agarosegel nicht die angegebenen Fragmentgrößen detektiert. Es konnte eine zusätzliche Schnittstelle festgestellt werden, die möglicherweise zuvor übersehen wurde. Die Fragmentgrößen betrugen 5.65Kb, 0.95Kb und 0.45Kb. Durch den Doppelverdau (*NcoI/HindIII*) wurden nicht drei sondern vier Fragmente mit den Größen 3.65Kb, 2.0Kb, 0.95Kb und 4.5Kb nachgewiesen.

3.4.2.6. Gelelektrophoretische Auftrennung der extrachromosomalen Fragmente

Die Auftrennung der extrachromosomalen Fragmente mit den Enzymen *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *NcoI* erfolgte in einem 0.75%igen Agarosegel.

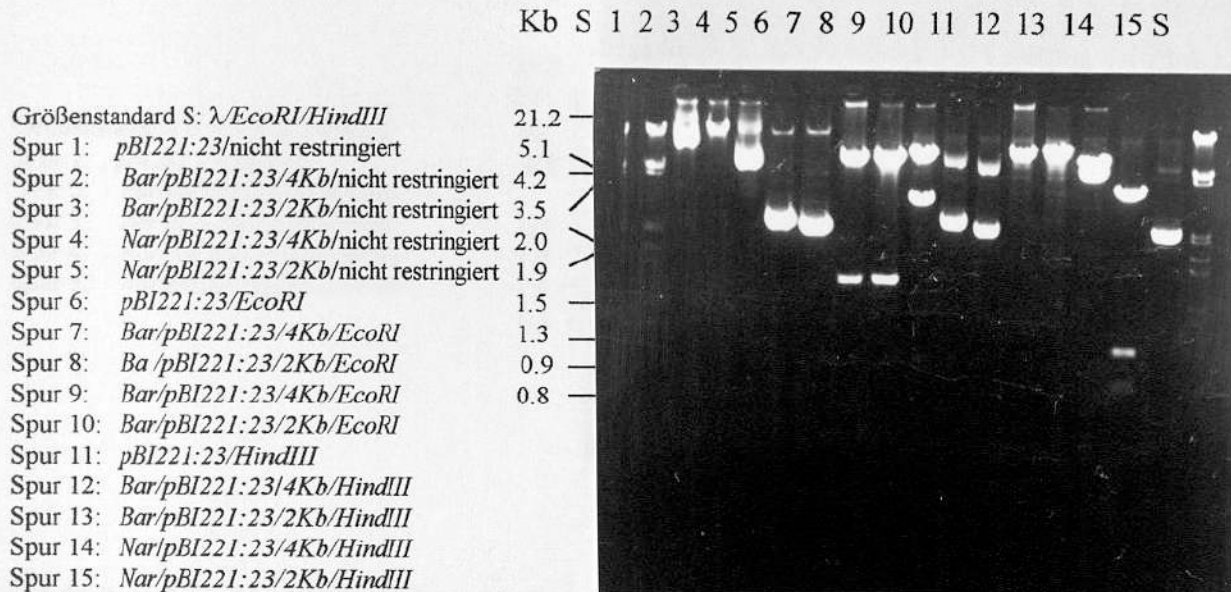


Abb.20 Darstellung einer 0.7%igen Agarose Gelelektrophorese mit den extrachromosomalen Fragmenten, die durch die Enzyme *EcoRI* und *HindIII* restringiert wurden.

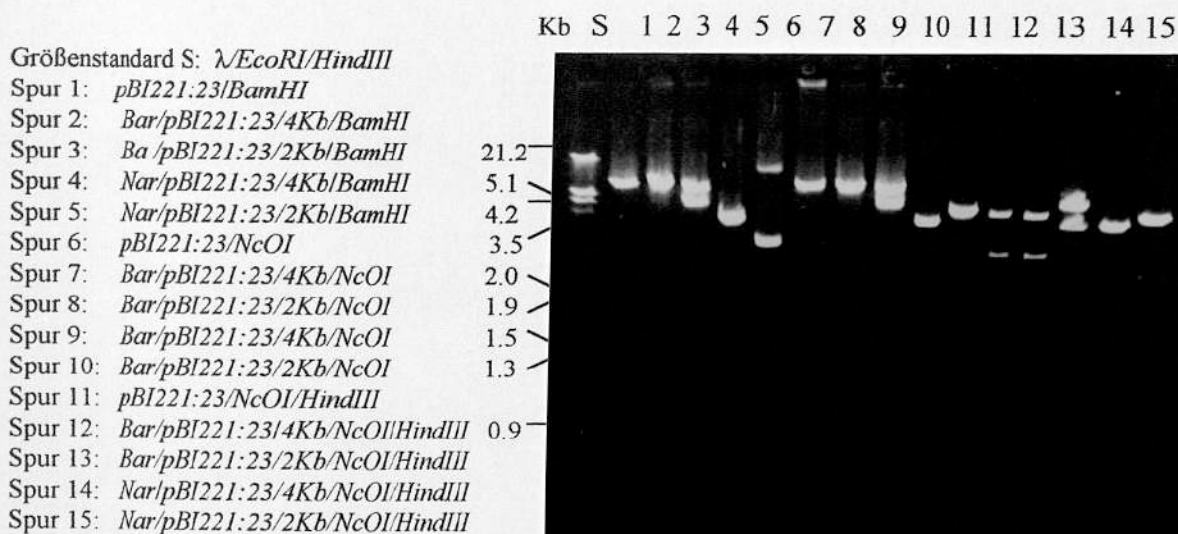


Abb.21 Darstellung einer 0.7%igen Agarose Gelelektrophorese mit den extrachromosomalen Fragmenten, die mit den Enzymen *BamHI*, *NcoI* und *NcoI/HindIII* restringiert wurden.

3.4.3.7. Tabellarische Darstellung der Restriktionsenzyme

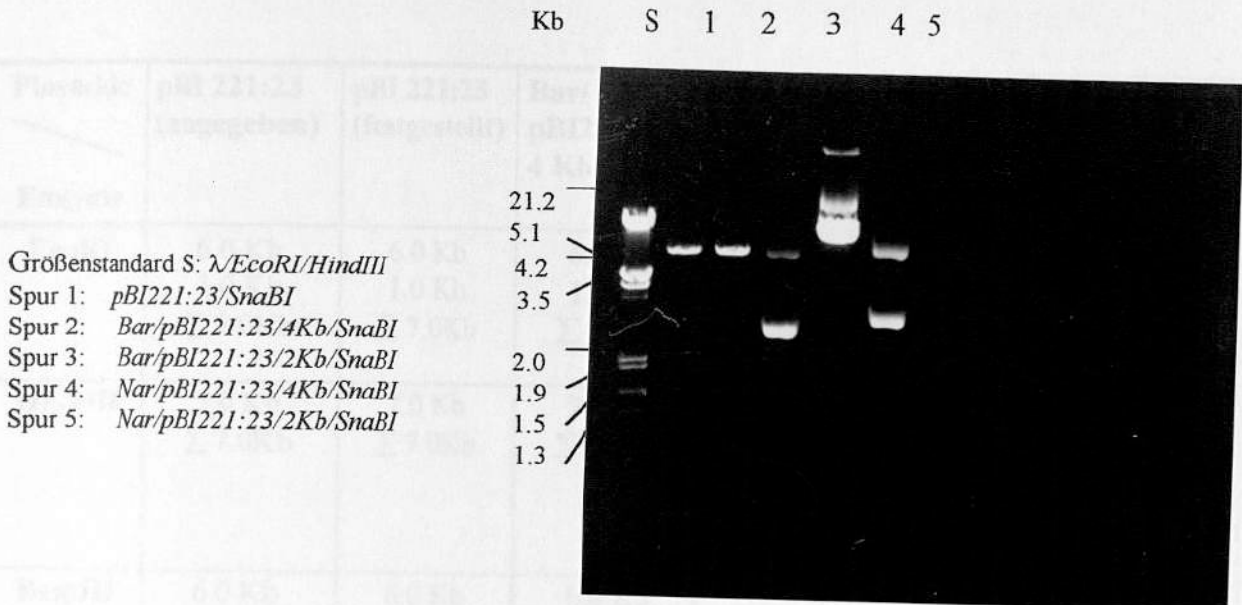


Abb.22 Darstellung einer 0.7%igen Agarose Gelelektrophorese mit den extrachromosomalen Fragmenten, die mit dem Enzym *SnaBI* restringiert wurden.

3.4.2.7. Tabellarische Darstellung der Restriktionsanalyse

Plasmide Enzyme	pBI 221:23 (angegeben)	pBI 221:23 (festgestellt)	Bar/ pBI221:23/ 4 Kb	Bar/ pBI221:23/ 2 Kb	Nar/ pBI221:23/ 4 Kb	Nar/ pBI221:23/ 2 Kb
EcoRI	6.0 Kb 1.0 Kb Σ 7.0Kb	6.0 Kb 1.0 Kb Σ 7.0Kb	6.0 Kb 1.0 Kb Σ 7.0Kb	6.3 Kb 2.6 Kb Σ 8.9Kb	Keine Schnittstelle	Keine Schnittstelle
HindIII	7.0 Kb Σ 7.0Kb	7.0 Kb Σ 7.0Kb	7.0 Kb Σ 7.0Kb	5.2 Kb 3.7 Kb Σ 8.9Kb	2.6 Kb 0.4 Kb 0.3 Kb Σ 3.3 Kb	Keine Schnittstelle
BamHI	6.0 Kb 1.0 Kb Σ 7.0Kb	6.0 Kb 1.0 Kb Σ 7.0Kb	6.0 Kb 1.0 Kb Σ 7.0Kb	5.2 Kb 3.7 Kb Σ 8.9Kb	2.6 Kb 0.4 Kb 0.3 Kb Σ 3.3 Kb	3.5 Kb Σ 3.5 Kb
NcoI	6.35 Kb 0.65 Kb Σ 7.0Kb	5.65 Kb 0.95 Kb 0.45 Kb Σ 7.05 Kb	5.65 Kb 0.95 Kb 0.45 Kb Σ 7.05 Kb	5.2 Kb 3.7 Kb Σ 8.9Kb	3.35 Kb Σ 3.35 Kb	3.5 Kb Σ 3.5 Kb
NcoI / HindIII	4.35 Kb 2.0 Kb 0.65 Kb Σ 7.0Kb	3.65 Kb 2.0 Kb 0.95 Kb 0.45 Kb Σ 7.05 Kb	3.65 Kb 2.0 Kb 0.95 Kb 0.45 Kb Σ 7.05 Kb	4.6 Kb 3.2 Kb 1.1 Kb Σ 8.9Kb	2.7 Kb 0.35 Kb 0.3 Kb Σ 3.35 Kb	3.5 Kb Σ 3.5 Kb
SnaBI	7.0 Kb Σ 7.0Kb	7.0 Kb Σ 7.05 Kb	7.0 Kb Σ 7.05 Kb	Keine Schnittstelle	Keine Schnittstelle	Keine Schnittstelle

Tab.5 Restriktionsanalyse der Plasmide mit den verschiedenen Restriktionsenzymen EcoRI, HindIII, BamHI, NcoI, NcoI/HindIII und SnaBI.

Wie der Tab.5 zu entnehmen ist, wurde im Kontrollplasmid *pBI221:23* eine zusätzliche Schnittstelle mit dem Enzym *NcoI* festgestellt, die in der Restriktionskarte nicht angegeben war. Eine Restriktion mit dieser Endonuklease ergibt drei unterschiedlich große Fragmente mit den Größen 5.65Kb, 0.95Kb, und 0.45Kb.

Bar/pBI221:23/4Kb: Dieses Plasmid weist nach einem Restriktionsverdau mit den o.g. Enzymen die identische Größe von 7.0Kb mit den gleichen Schnittstellen wie das Kontrollplasmid auf, welche ursprünglich zur biolistischen Transformation für die Mooskulturen verwendet wurde. Durch diese Restriktionsanalyse wurde bestätigt, daß es sich hierbei um das gleiche Plasmid handelt, welches ursprünglich zur biolistischen Transformation für die Mooskulturen verwendet wurde.

Bar/pBI221:23/2Kb: Dieses Plasmid weist eine Größe von 8.9Kb auf. Durch eine Spaltung mit dem Enzym *EcoRI* ergeben sich zwei Fragmente mit den Größen 6.3Kb und 2.6Kb. Nach einer Restriktion mit den Endonukleasen *HindIII*, *BamHI* und *NcoI* entstehen jeweils zwei Fragmente mit den Größen 5.2Kb und 3.7Kb. Durch eine Spaltung mit zwei Enzymen (*NcoI/HindIII*) entstehen drei Fragmente mit den Größen 3.65Kb, 2.0Kb, 0.95Kb und 0.45Kb. Das Plasmid war durch das Enzym *SnaBI* nicht zu spalten.

Nar/pBI221:23/4Kb: Dieses Plasmid weist eine Größe von 3.35Kb auf. Nach einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRI* und *SnaBI* war das Plasmid nicht zu schneiden. Durch die Endonuklease *HindIII* und auch *BamHI* wurden drei Fragmente mit den Größen 2.6Kb, 0.4Kb und 0.3Kb nachgewiesen. Durch das Enzym *NcoI* wurde das Plasmid linearisiert. Nach einer Spaltung mit dem Doppelenzym (*NcoI/HindIII*) ergaben sich drei Fragmente mit den Größen 2.7Kb, 0.35Kb und 0.3Kb.

Nar/pBI221:23/4Kb: Dieses Plasmid weist eine Größe von 3.5Kb auf. Durch das Enzym *EcoRI* sowie *HindIII* konnte keine Spaltung erreicht werden. Mit den Enzymen *BamHI*, *NcoI* und dem Doppelverdau (*NcoI/HindIII*) wurde das Plasmid linearisiert.

Aufgrund der Restriktion mit den oben genannten Restriktionsendonukleasen (Tab.5) konnten die Restriktionskarten der jeweiligen Plasmide erstellt werden.

3.4.2.8. Erstellung der Restriktionskarten aus den Plasmiden *pBI221:23*, *Bar/pBI221:23/4Kb*, *Bar/pBI221:23/2Kb*, *Nar/pBI221:23/4Kb* und *Nar/pBI221:23/2Kb*

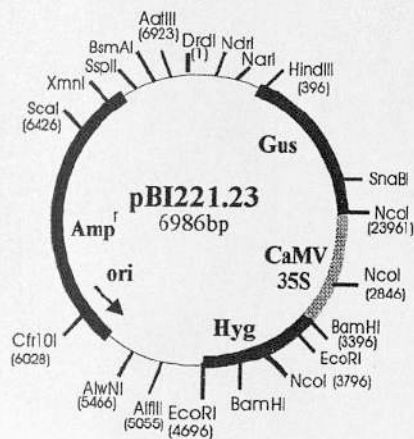


Abb.21 Darstellung des Ausgangsplasmids *pBI221:23*, das zur biolistischen Transformation verwendet wurde.

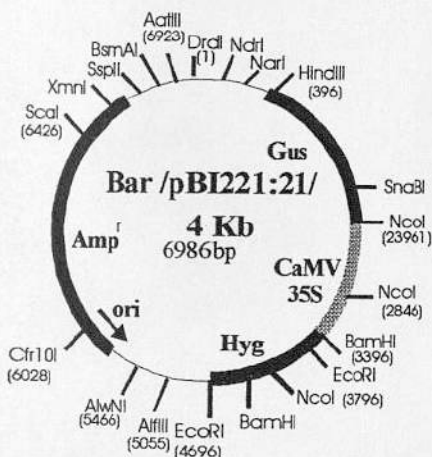


Abb.22 Darstellung der Restriktionskarte aus dem Plasmid *Bar/pBI221:23/4Kb*. Bei diesem Plasmid sind die gleichen Schnittstellen wie im Ausgangsplasmid zu beobachten. Zudem weist es die gleiche Größe auf.

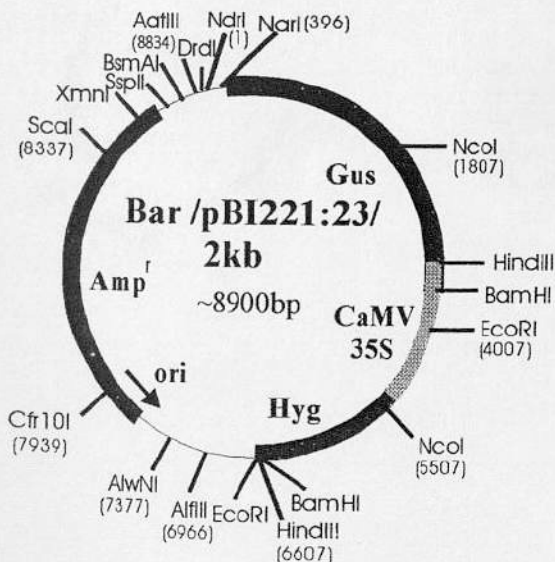


Abb.23 Darstellung der Restriktionskarte des Plasmids *Bar/pBI221:23/2Kb*. Dieses plasmid weist eine Größe von 8.900Kb auf. Eine mögliche Duplizierung des Teil Gus-Gen Fragments wäre nicht auszuschließen, da die Schnittstellen im Bereich HindIII und NcoI verschoben sind.

3.4.3. Southern-Analyse der Plasmide *pBI221:23*, *Bar/pBI221:23/4Kb*, *Bar/pBI221:23/2Kb*, *Nar/pBI221:23/4Kb* und *Nar/pBI221:23/2Kb* mit dem Hygromycin-Gen als Hybridisierungs-sonde

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob die Plasmide das Hygromycin-Gen beinhalten oder nicht, wurde eine Southern-Analyse mit dem Hygromycin-Gen als Hybridisierungs-sonde durchgeführt.

Die Plasmide wurden durch Restriktionsendonukleasen gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und eine Southern-Hybridisierung durchgeführt.

3.4.3.1. Gelelektrophoretische Analyse der Plasmide *pBI221:23*, *Bar/pBI221:23/4Kb*, *Bar/pBI221:23/2Kb*, *Nar/pBI221:23/4Kb* und *Nar/pBI221:23/2Kb*

Bevor der Southern-Blot erfolgte, wurde ein Foto von dem zu blottenden Agarosegel angefertigt, um zu sehen, ob alle Plasmide in gleicher Konzentration aufgetragen sind und um später einen Vergleich des Blots und des Agarosegels anstellen zu können.

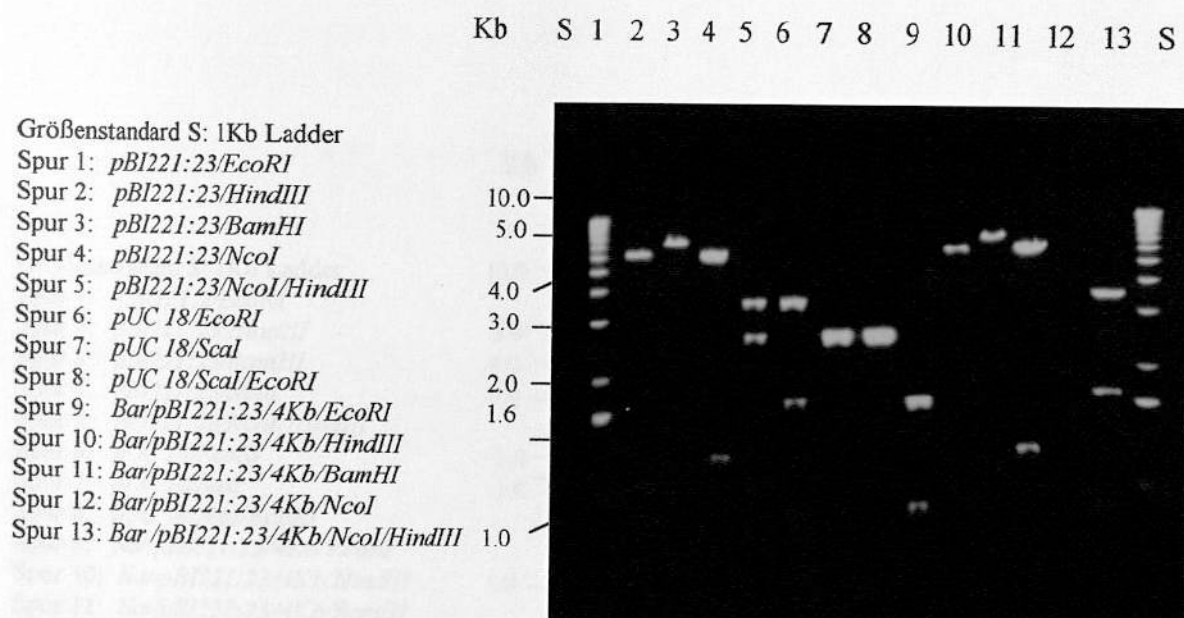


Abb.26 0.75%ige Agarosegelelektrophorese der Plasmide, die durch die Enzyme *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *ScaI* und *NcoI* restringiert wurden.

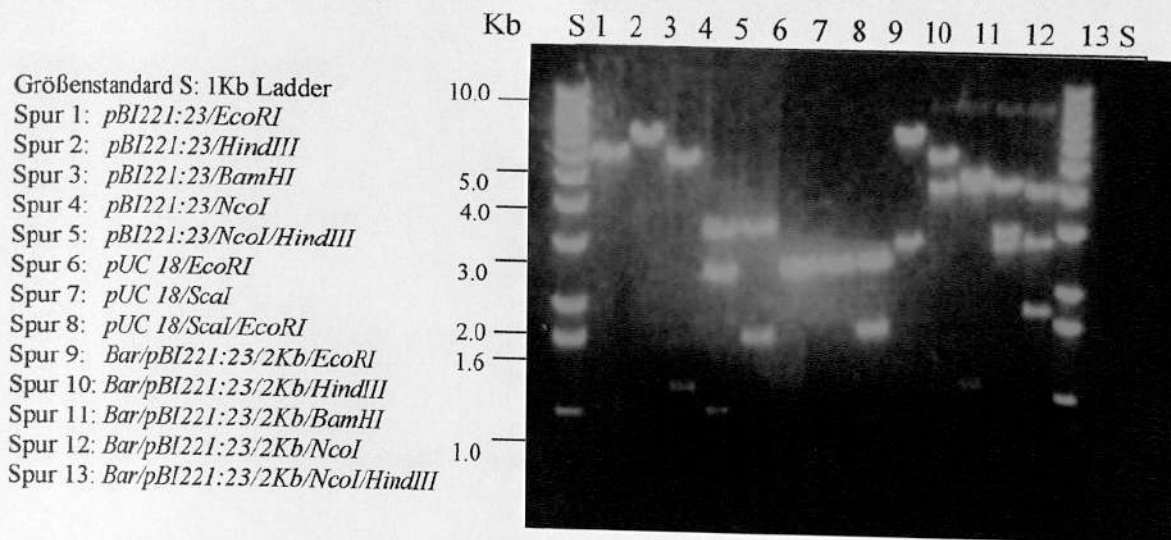


Abb.27 0.75%ige Agarosegelelektrophorese der Plasmide, die durch die Enzyme *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* und *NcoI* restrigiert wurden.

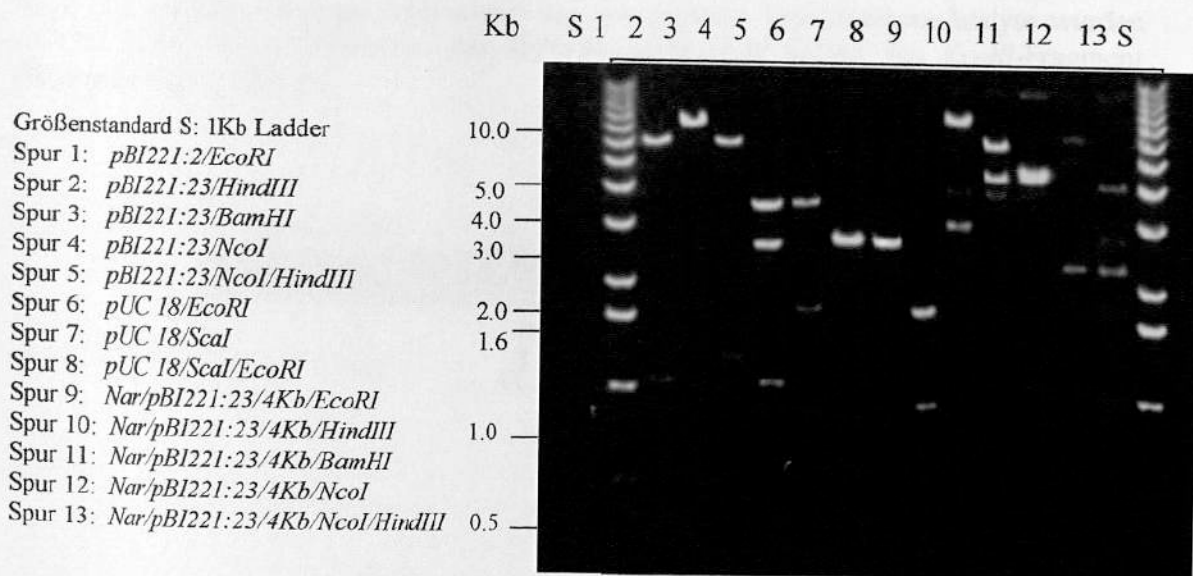


Abb.28 0.75%ige Agarosegelelektrophorese der Plasmide, die durch die Enzyme *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* und *NcoI* restrigiert wurden.

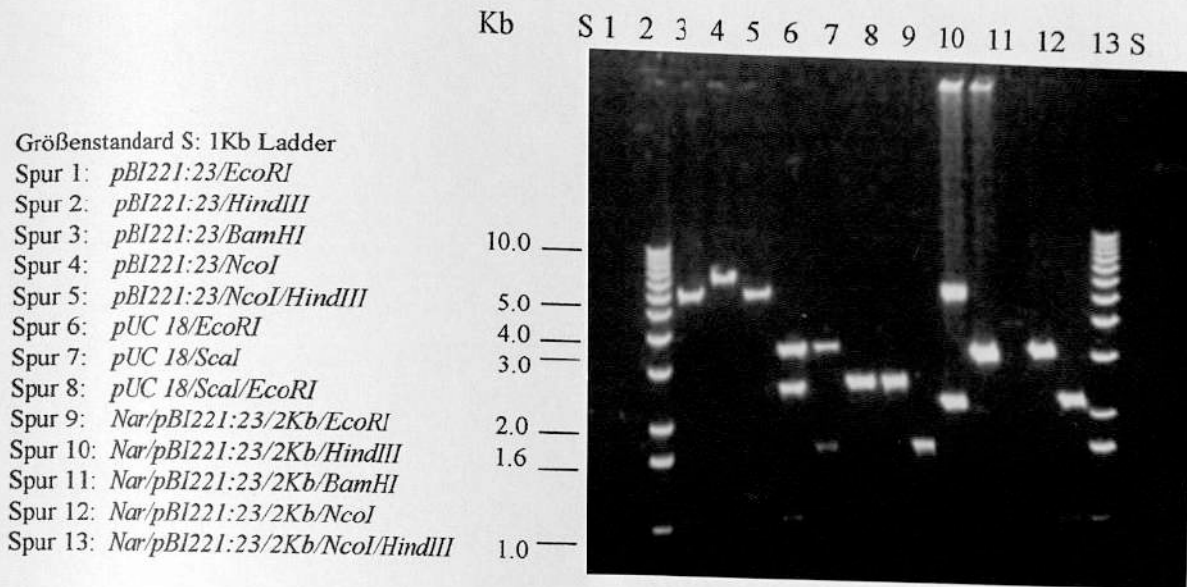


Abb.29 0.75%ige Agarosegelelektrophorese der Plasmide, die durch die Enzyme *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* und *NcoI* restriert wurden.

3.4.3.2. Southern-Blot der Plasmide *pBI221:23*, *Bar/pBI221:23/4Kb*, *Bar/pBI221:23/2Kb*, *Nar/pBI221:23/4Kb* und *Nar/pBI221:23/2Kb*

Nach der Anfertigung eines Fotos wurde das Gel geblottet. Zur Southern-Analyse wurden jeweils 0.3µg DNA verwendet. Als Hybridisierungssonde diente das *EcoRI*-Fragment (Hygromycingen, Abb.30)

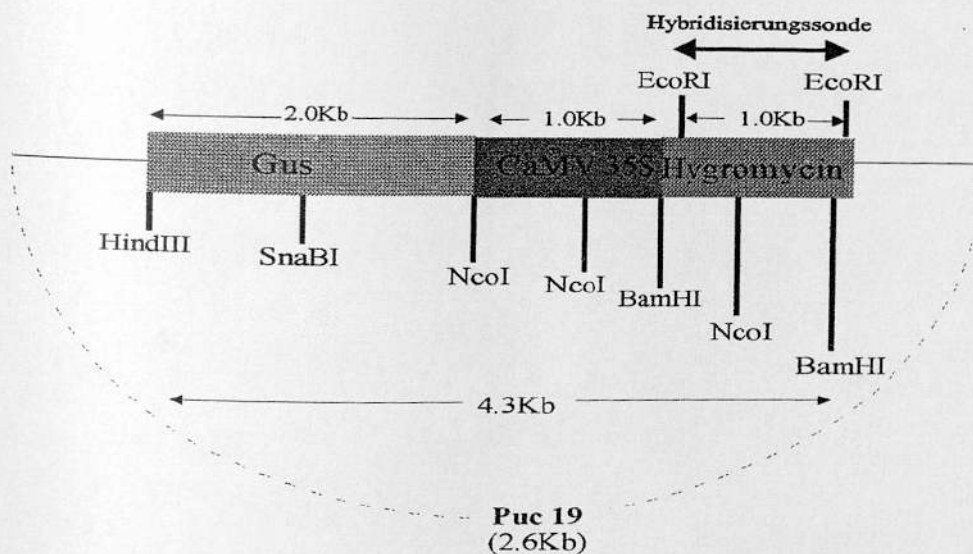


Abb.30 Darstellung der Hybridisierungssonde, das zur Southern-Analyse verwendet wurde

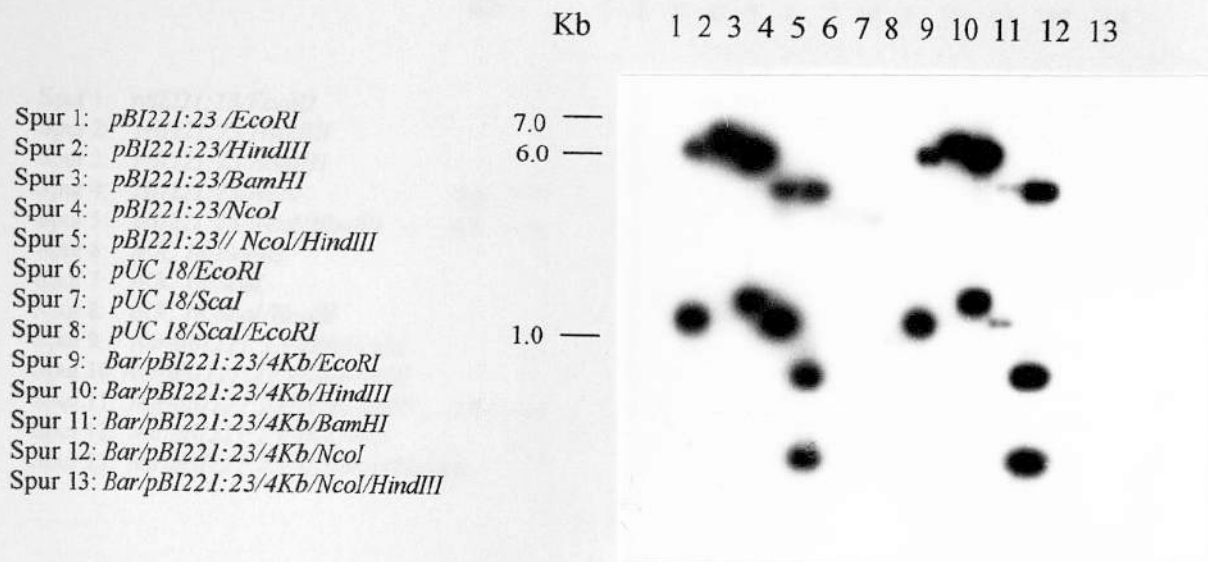


Abb.31 Southern-Analyse der Plasmide, Restriktion durch die Enzyme *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *ScaI* und *NcoI*. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 0.8%igen Agarosegel und die Hybridisierung wurde mit dem Dig-markierten Hygromycingen ausgeführt.

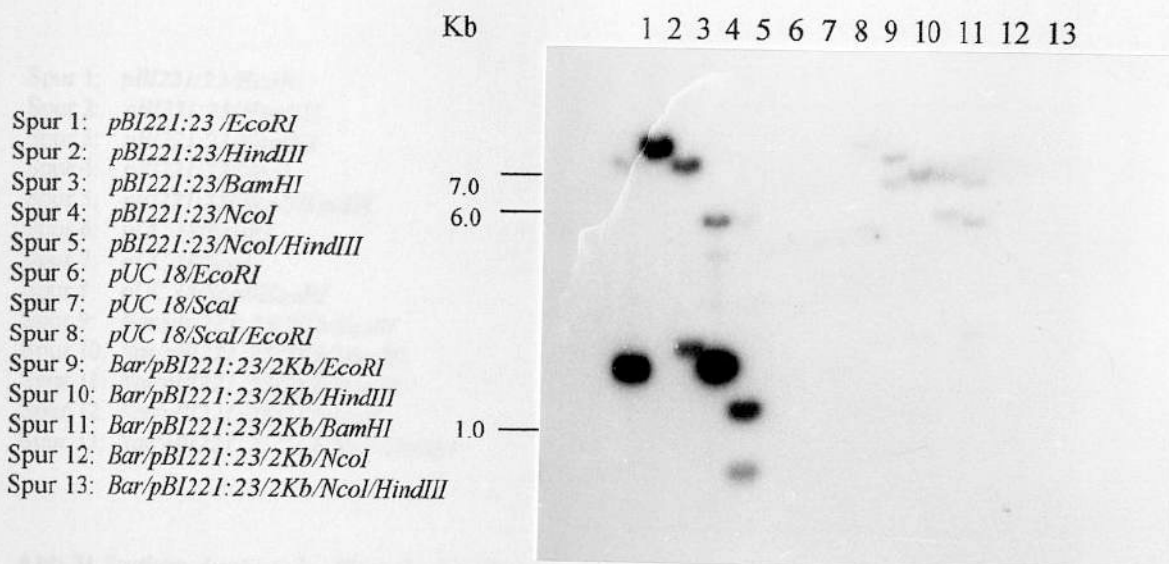


Abb.32 Southern Analyse der Plasmide, Restriktion durch die Enzyme *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *ScaI* und *NcoI*. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 0.8%igen Agarosegel und die Hybridisierung wurde mit dem Dig-markierten Hygromycingen ausgeführt.

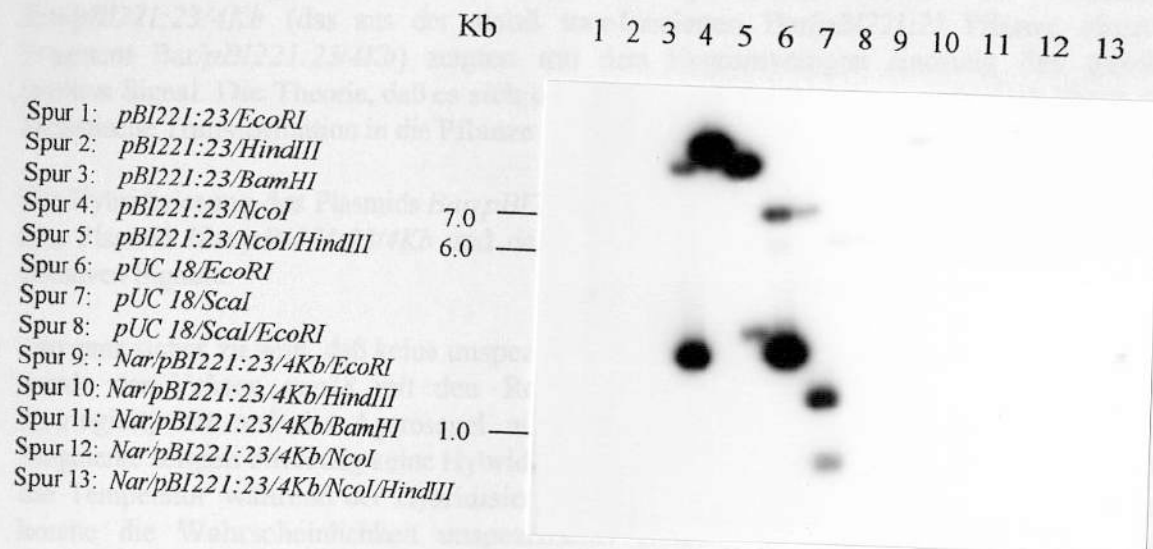


Abb.33 Southern Analyse der Plasmide, Restriktion durch die Enzyme *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *ScaI* und *NcoI*. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 0.8%igen Agarosegel und die Hybridisierung wurde mit dem Dig-markierten Hygromydingen ausgeführt.

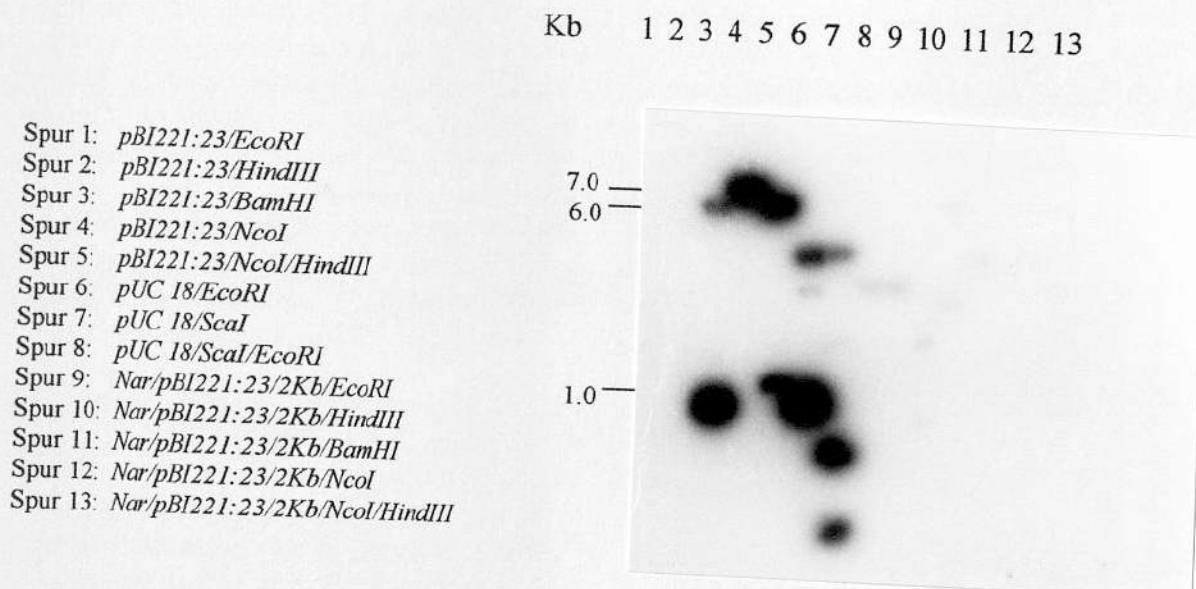


Abb.34 Southern Analyse der Plasmide, Restriktion durch die Enzyme *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *ScaI* und *NcoI*. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 0.8%igen Agarosegel und die Hybridisierung wurde mit dem Dig-markierten Hygromydingen ausgeführt.

Die Hybridisierungen des Kontrollplasmids *pBI221:23* sowie des Plasmids *Bar/pBI221:23/4Kb* (das aus der stabil transformierten *Bar/pBI221:23* Pflanze eluierte Fragment *Bar/pBI221:23/4Kb*) zeigten mit dem Hygromycingen eindeutig das gleiche positive Signal. Die Theorie, daß es sich um das Plasmid handelt, das ursprünglich durch die biolistische Transformation in die Pflanze transformiert wurde, hat sich daher bestätigt.

Die Hybridisierung des Plasmids *Bar/pBI221:23/2Kb* mit dem Hygromycingen erfolgte nicht. Das Plasmid *Nar/pBI221:23/4Kb* und das Plasmid *Nar/pBI221:23/2Kb* zeigten auch keine positiven Signale.

Um ganz sicher zu sein, daß keine unspezifischen Bindungen bei der Hybridisierung erfolgte, wurde der Vektor *puc18* mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *ScaI* und *EcoRI/ScaI* restringiert, mit auf das Agarosegel aufgetragen und mit in dem Gel geblottet. Diese Fragmente zeigten eindeutig keine Hybridisierung mit dem Hygromycingen. Außerdem wurde die Temperatur während der Hybridisierung um 3-5°C erhöht. Durch diese Maßnahmen konnte die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen während der Hybridisierung verringert werden.

Diskussion:

Die Rekombination ist unentbehrlich für das Überleben der Lebewesen. Sie bietet genetische Variabilität und somit eine Anpassung an eine sich verändernde Umwelt. Zudem ist sie an der Entstehung der genetischen Vielfalt (Sancer & Sancer, 1988) genauso an der Reparatur und der Regulation der Genexpression beteiligt (Glasgow et al., 1989).

In den letzten 20 Jahren wurde sehr viel über die Entwicklungsphysiologie und die Regulation von *Physcomitrella* bekannt (Cove & Ashton, 1984; Ashton & Cove, 1990; Cove, 1992). Das Laubmoos *Physcomitrella* wird als ein genetisches Modellsystem zur Untersuchung der Entwicklungsphysiologie der Pflanzen verwendet. Ein großer Vorteil besteht in deren dominierten haploiden Lebenszyklus. Weiterhin wurden zahlreiche Versuche, sei es in der Hormonphysiologie (Wang et al., 1980; Wang et al., 1981; Reski & Abel, 1985; Ashton et al., 1995) oder in Tropismen (Knight & Cove, 1989) durchgeführt.

Ebenfalls wurden auch zahlreiche molekularbiologische Untersuchungen an *Physcomitrella* durchgeführt. Seit 1989 wird die Plastidenteilungsmutante PC22 untersucht, bei welcher die geregelte Chloroplastenteilung ausfällt. Das Charakteristische dieser Mutante ist das Vorhandensein eines einzigen Makrochloroplasten (Reski et al., 1986), in seltenen Fällen ist diese Mutante auch plastidenfrei (Reski et al., 1990; Abel et al., 1989).

Transformationsexperimente können zur Untersuchung der Rekombination dienen. Die genetische Transformation stellt ein essentielles Werkzeug für die moderne molekulare Genetik dar (Übersichtsartikel von Ashton et al., 1994). In den meisten Eukaryoten findet die genetische Transformation über illegitime Rekombination, d.h. eine zufällige Integration der Fremd-DNA, statt (Schäfer & Zryd, 1997). Das Vorhandensein einer homologen Sequenz führt zu einer homologen Rekombination, wobei hier die Fremd-DNA in den eigenen Chromosomenlokus integriert wird (Schäfer & Zryd, 1997). Ursprünglich wurde dies bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Hinnen et al., 1978) beobachtet. Dieses Ereignis ist eine Voraussetzung für genetische Experimente wie z.B. „gene disruption“ und „allele replacement“ (Berg, 1991). Eine erfolgreiche Anwendung von Allel-Substitution ist von dem Verhältnis von homologer zu illegitimer Rekombination abhängig und dieses Verhältnis ist bei den Eukaryoten sehr variabel (Schäfer & Zryd, 1997).

Eine effiziente Transformation von 10% wurde bisher nur bei niederen Eukaryonten wie Hefe (Grimm & Kohli, 1986; Struhl 1983), einigen filamentären Pilzen (Fotheringham & Holloman, 1989; Krohnstad et al., 1989; Paietta & Marzluf, 1985; Shiotani & Tsuge, 1995; Timberlake & Marshall, 1989), bei *Dictyostelium discoideum* (De Lozanna & Spudich, 1987), Trypanosomadeae (Cruz & Beverley, 1990; ten Asbrock et al., 1990) und in den B-Lymphozyten der Hühner (Buerstedde & Takeda, 1991) beobachtet. In *Physcomitrella* wurde mit Hilfe der biolistischen Transformation eine effiziente Transformation von 5% erreicht (Übersichtsartikel von Knight, 1994).

In den meisten Eukaryoten ist die effiziente Transformationsrate sehr gering, bei einer zufälligen Integration variiert sie zwischen 10^{-2} - 10^{-5} in Säuger Zellen (Bollag et al., 1989) und 10^{-3} - 10^{-5} in pflanzlichen Protoplasten (Ohl et al., 1994). Aus diesem Grunde ist Allel-Substitution nicht direkt anwendbar in tierischen- und pflanzlichen Zellen, obwohl diese eine gut etablierte Routine-Methode in der Hefe *S. cerevisiae* darstellt, bei der exogene DNA fast ausschließlich über homologe Rekombination in das Genom integriert wird (Rothstein, 1991).

Durch die NPTII-Intronkonstrukte sollte über die biolistische Transformation (Sawahel et al., 1992) das Moos *Physcomitrella* transformiert werden. Der Ort der Replikation für die Plasmide sollte ermittelt werden. Die räumliche und zeitliche Trennung von Transkription und Translation ermöglicht den Eukaryonten eine viel kompliziertere Regulation der Genexpression, was zur Vielfalt eukaryontischer Formen und Funktion beiträgt (Stryer, 1994). Es erfolgt eine umfangreiche Prozessierung neuer RNA die zur Bildung von mRNA bestimmt ist. Jede Vorläufer mRNA der Eukaryonten wird gespleißt. Aus den Primärtranskripten werden präzise Introne herausgeschnitten, und es bilden sich reife mRNAs, die fortlaufende Informationen beinhalten (Stryer, 1994). Dieser Spleißmechanismus erfolgt im Kern, die Introne können nur im Kern herausgespleißt werden (Wiebauer et al., 1988; Kopriva et al., 1995; Lou et al., 1993).

Durch eine Transformation und entsprechender Selektion durch Kanamycin, kann die Genaktivität beobachtet werden. Bei Erhalt von Kanamycin resistenten Pflanzen, wobei der Stabilitätsgrad nicht relevant ist, kann man davon ausgehen, daß die Prozessierung des Transkriptes im Kern erfolgt ist und somit eine Schlußfolgerung ziehen, daß die Replikation im Kern stattgefunden hat.

Da die Anzahl der nichtstabil transformierten Pflanzen in *Physcomitrella* sehr hoch ist, sollte die mögliche Steuerung der Regulation vom Kern oder Organellen untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden folgende Ergebnisse belegt:

- 1) Durch die biolistische Transformation mit den NPTII-Intronkonstrukten wurden nichtstabile und transiente Transformanten erhalten, jedoch keine stabile Transformante.
- 2) Durch das Intronkontrollkonstrukt *pT13d2* konnte ebenfalls keine stabile Transformante erhalten werden.
- 3) Durch das zusätzliche Konstrukt *pJIT161* - welches schon über längere Zeit im Labor als Kontrollkonstrukt mit guten Ergebnissen diente – konnten stabile Transformanten erhalten werden.
- 4) Die DNA-Konzentration in der Transformationssuspension für die biolistische Transformation hat einen Einfluß auf die Transformationsrate.
- 5) Nach einer genomischen DNA Isolierung in der stabil transformierten Mooskultur (Nar/pBI221:23 und Bar/pBI221:23) wurden im Agarosegel extrachromosomale Banden detektiert. Diese Banden wurden durch Restriktionsanalysen näher charakterisiert.

- 6) Durch eine Southern-Analyse der unrestringierten genomischen DNA wurde die Bestätigung gegeben, daß es sich um das Plasmid handelt welches ursprünglich zur biolistischen Transformation verwendet wurde.
- 7) In der Restriktionsanalyse wies das Fragment *Bar/pBI221:23/4Kb* das gleiche Restriktionsmuster auf wie das Plasmid, das ursprünglich zur biolistischen Transformation der Mooskulturen verwendet wurde.
- 8) Das Plasmid *Bar/pBI221:23/4Kb* wurde einer Southern-Analyse unterzogen, dieses bestätigte mit der Hybridisierung des Hygromycin-Gens das obige Ergebnis.
- 9) Das Plasmid *Bar/pBI221:23/2Kb* wies eine Größe von 8.9Kb auf.
- 10) Die beiden Plasmide *Nar/pBI221:23/4Kb* und *Nar/pBI221:23/2Kb* wiesen jeweils eine Größe von 3.5Kb auf.

Da die Anzahl der nichtstabil transformierten Pflanzen in *Physcomitrella* sehr hoch ist, sollte die mögliche Steuerung der Regulation vom Kern oder Organellen untersucht werden. Darüber hinaus sollten die stabil transformierten Kulturen durch Southern Analyse studiert werden, um die mögliche Integration des Plasmides zu beobachten.

Leider wurde nach einer biolistischen Transformation durch die NPTII-Intronkonstrukte nur nichtstabile- und transiente Transformanten erhalten. Es ist schwer, eine konkrete Aussage zu machen, da durch das Intronkontrollkonstrukt *pT13d2* - welches kein synthetisches Intron enthält - auch keine stabilen Transformanten erhalten wurde. Im Gegensatz zu dem Konstrukt *pT13d2*, wurden durch das zusätzliche Kontrollkonstrukt *pJIT161* stabile Transformanten erhalten. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß der Grund für eine stabile Transformation nicht die verwendeten Intronkonstrukte waren, sondern die Stärke des gebrauchten Promotors (pers. Mitteilung von Dr.C.D.Knight). Das Konstrukt *pJIT161* enthält einen CaMV 35S Promotor, wobei das NPTII-Intronkonstrukt den NOS Promotor enthält. Um diese Vermutung bestätigen zu lassen, könnten die Intronkonstrukte mit dem 35S Promotor konstruiert werden. Eine biolistische Transformation dieser Konstrukte könnte diese Vermutung vielleicht bestätigen. Über solch eine Transformation berichtet Schäfer et al. (1991), in *Physcomitrella* mit unterschiedlichen Plasmiden, allerdings wurde die Transformation über die PEG-Fusionstechnik durchgeführt. Inwieweit diese PEG-Fusionstechnik mit der biolistischen Transformation vergleichbar ist, ist fraglich, da die Transformationsraten zu weit auseinander liegen.

Bei der biolistischen Transformation hat die DNA-Konzentration in der Transformationssuspension einen positiven Einfluß auf die Transformationsrate. Durch die Transformation mit 1,0µg DNA wurde mit dem Konstrukt *pJIT161* eine Transformationsrate von 3.9% erreicht, während mit einer Konzentration von 1,5µg DNA eine Transformationsrate von 5.5% erreicht wurde. Durch die Erhöhung der DNA-Konzentration wurde ebenfalls eine positive Korrelation mit den Intronkonstrukten festgestellt, wobei es sich hier um die nichtstabilen Transformanten handelt.

- 6) Durch eine Southern-Analyse der unrestringierten genomischen DNA wurde die Bestätigung gegeben, daß es sich um das Plasmid handelt welches ursprünglich zur biolistischen Transformation verwendet wurde.
- 7) In der Restriktionsanalyse wies das Fragment *Bar/pBI221:23/4Kb* das gleiche Restriktionsmuster auf wie das Plasmid, das ursprünglich zur biolistischen Transformation der Mooskulturen verwendet wurde.
- 8) Das Plasmid *Bar/pBI221:23/4Kb* wurde einer Southern-Analyse unterzogen, dieses bestätigte mit der Hybridisierung des Hygromycin-Gens das obige Ergebnis.
- 9) Das Plasmid *Bar/pBI221:23/2Kb* wies eine Größe von 8.9Kb auf.
- 10) Die beiden Plasmide *Nar/pBI221:23/4Kb* und *Nar/pBI221:23/2Kb* wiesen jeweils eine Größe von 3.5Kb auf.

Da die Anzahl der nichtstabil transformierten Pflanzen in *Physcomitrella* sehr hoch ist, sollte die mögliche Steuerung der Regulation vom Kern oder Organellen untersucht werden. Darüber hinaus sollten die stabil transformierten Kulturen durch Southern Analyse studiert werden, um die mögliche Integration des Plasmides zu beobachten.

Leider wurde nach einer biolistischen Transformation durch die NPTII-Intronkonstrukte nur nichtstabile- und transiente Transformanten erhalten. Es ist schwer, eine konkrete Aussage zu machen, da durch das Intronkontrollkonstrukt *pT13d2* - welches kein synthetisches Intron enthält - auch keine stabilen Transformanten erhalten wurde. Im Gegensatz zu dem Konstrukt *pT13d2*, wurden durch das zusätzliche Kontrollkonstrukt *pJIT161* stabile Transformanten erhalten. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß der Grund für eine stabile Transformation nicht die verwendeten Intronkonstrukten waren, sondern die Stärke des gebrauchten Promotors (pers. Mitteilung von Dr.C.D.Knight). Das Konstrukt *pJIT161* enthält einen CaMV 35S Promotor, wobei das NPTII-Intronkonstrukt den NOS Promotor enthält. Um diese Vermutung bestätigen zu lassen, könnten die Intronkonstrukte mit dem 35S Promotor konstruiert werden. Eine biolistische Transformation dieser Konstrukte könnte diese Vermutung vielleicht bestätigen. Über solch eine Transformation berichtet Schäfer et al. (1991), in *Physcomitrella* mit unterschiedlichen Plasmiden, allerdings wurde die Transformation über die PEG-Fusionstechnik durchgeführt. Inwieweit diese PEG-Fusionstechnik mit der biolistischen Transformation vergleichbar ist, ist fraglich, da die Transformationsraten zu weit auseinander liegen.

Bei der biolistischen Transformation hat die DNA-Konzentration in der Transformationssuspension einen positiven Einfluß auf die Transformationsrate. Durch die Transformation mit 1,0µg DNA wurde mit dem Konstrukt *pJIT161* eine Transformationsrate von 3.9% erreicht, während mit einer Konzentration von 1,5µg DNA eine Transformationsrate von 5.5% erreicht wurde. Durch die Erhöhung der DNA-Konzentration wurde ebenfalls eine positive Korrelation mit den Intronkonstrukten festgestellt, wobei es sich hier um die nichtstabilen Transformanten handelt.

Mit den NPTII-Intronkonstrukten *pINS2* und *pINS4a* transformierte Mooskulturen wiesen eine vitale Regeneration auf als die übrigen Regeneranten. Möglicherweise hat die Positionierung der synthetischen Introns einen Einfluß, weil sich in beiden Fällen die Introns an den Enden des NPTII-Gens befinden.

Die Bestätigung, daß es sich bei den extrachromosomalen Fragmenten – der aus der stabil transformierten MNNG-Mutante isolierten genomischen DNA – um das Plasmid handelt, welches ursprünglich durch die biolistische Transformation in die Mooskultur transformiert wurde, zeigte sich einerseits durch die Southern-Analyse, andererseits durch das identische Restriktionsmuster im Agarosegel. Eine Bestätigung durch die Southern-Analyse wurde an der unrestringierten genomischen DNA dargelegt.

Das Plasmid *Bar/pBI221:23/4Kb* wurde durch unterschiedliche Restriktionsenzyme gespalten und einer Southern-Analyse unterzogen. Unter äußerst stringenten Bedingungen fand eine Hybridisierung mit dem Hygromycin-Gen statt, bei der das gleiche Hybridisierungsmuster wie bei dem Plasmid *pBI221:23* detektiert wurde.

Das Plasmid *Bar/pBI221:23/2Kb* - welches aus der gleichen genomischen DNA wie *Bar/pBI221:23/4Kb*, nur aus einem anderen Fragment eluiert wurde - zeigte ein unterschiedliches Restriktionsmuster und keine Hybridisierung mit dem Hygromycin-Gen in der Southern-Analyse. Die Größe beträgt 8.900Kb, wobei das ursprüngliche Plasmid, welches in die Mooskulturpflanze durch die biolistische Transformation transformiert wurde eine Größe von 6.986Kb hat. Hier ist eine mögliche Duplikation während der Replikation als Ursache zu bedenken. Schäfer & Zryd (1997) berichten, daß in den meisten Eukaryoten über eine genetische Transformation die illegitime Rekombination d.h. eine zufällige Integration der Fremd-DNA stattfindet. Roth & Wilson (1988) berichten über die illegitime Rekombination als ein Prozeß in zwei Schritten: Als erstes entstehen freie DNA-Enden, hauptsächlich nach Fehlern im DNA-Metabolismus (Replikation, Reparatur, Transkription, Rekombination), diese werden dann im zweiten Schritt wieder miteinander verbunden, unabhängig von den terminalen Sequenzen.

Allerdings konnte keine genaue Aussage darüber gemacht werden, welches Gen dupliziert wurde. Durch eine Restriktion mit dem Restriktionsenzym *SnaBI* im Gus-Gen fand keine Spaltung statt. Während der Duplikation könnte sich die eine oder andere Base verändern und somit würde keine Möglichkeit bestehen das Plasmid zu spalten.

Im Hygromycin-Gen wurde ebenfalls keine Spaltung mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* festgestellt. Als mögliche Ursache kann außerdem noch an eine C-Methylierung gedacht werden. Gruenbaum et al. (1981) berichtet über pflanzliche Genome, die sehr stark methyliert sind. Durch Promotormethylierung wird die Expression von Transgenen in Tabak inhibiert (Weber et al., 1990; Hershkovitz et al., 1990). In einem Übersichtsartikel von Ashton (1994) wurde in *Physcomitrella* durch Zugabe von 5-Azacytidin ins Medium versucht eine mögliche Inhibierung durch Methylierung aufzuheben und eine erhöhte Transformationsrate der stabilen Transformanten zu erhalten, dieses wurde leider nicht erreicht, wobei in *Funaria hygrometrica* eine leichte Erhöhung erreicht wurde.

Die Plasmide *Nar/pBI221:23/4Kb* und *Nar/pBI221:23/2Kb* - welche aus der Pflanze *Nar/pBI221:23* aus der genomischen DNA isoliert wurden - wiesen nach einer Spaltung mit den Restriktionsenzymen eine Größe von 3.500Kb und 3.350Kb auf. In diesem Fall kann eine Deletion vermutet werden.

Diese beiden Plasmide konnten weder mit dem Restriktionsenzym *SnaBI*, welches das Gus-Gen spaltet, noch mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten werden, daß das Hygromycin-Gen spaltet. Durch eine Deletion könnte auch eine Base verändert werden, so daß eine Restriktion unmöglich wird.

Die aus der genomischen DNA isolierten Plasmide könnten durch die biolistische Transformation wieder in die Mooskultur transformiert werden. Eine Transformation wie oben beschrieben wurde einmal durchgeführt, leider wurden keine Transformanten erhalten. Dieses Experiment könnte noch mal wiederholt werden, weil keine Regeneranten identifiziert wurden.

Um präzisere Aussagen machen zu können, würde beispielsweise eine Sequenzanalyse sehr aufschlußreich sein, da sie die Vermutung der Duplikation oder Deletion bestätigen oder entkräften würde. Durch den enormen Zeitdruck der praktischen Arbeit im Labor konnte dieses Experiment nicht durchgeführt werden, zumal das Plasmid eine umfangreiche Größe hat.

Zusammenfassung:

In dieser Arbeit wurde das allgemeine Rekombinationsvermögen durch die biolistische Transformation mit den NPTII-Intronkonstrukten in *Physcomitrella* untersucht. Die biolistische Transformation erfolgte durch vier unterschiedlich positionierte synthetische Intronkonstrukte an der durch MNNG induzierte Mutante *pabA3* (Ashton & Cove, 1977). Durch die biolistische Transformation wurden keine stabilen, dafür viele nichtstabile und transiente Transformanten erhalten. Auch durch die Transformation des Kontrollkonstruktes *pT13d2* wurden keine stabilen Transformanten erhalten. Als zusätzliches Kontrollkonstrukt wurde *pJIT161* verwendet, wobei durch dieses Konstrukt stabile Transformanten erhalten wurde. Der Unterschied dieser Plasmide besteht in deren Promotor und deren Größe. Das Konstrukt *pJIT161* enthält einen vom Promotor des CaMV 35S Promoter und die Größe dieses Plasmids beträgt 4.221Kb. Das Konstrukt *pT13d2* enthält ein vom Promotor des Nopalinsynthasegens und ihre Größe beträgt 3.888Kb. Eine Erhöhung der DNA-Konzentration in der Transformationssuspension wirkte sich positiv auf die Transformationsrate aus.

Weshalb keine stabilen Transformanten durch die NPTII-Intronkonstrukte erhalten wurde, liegt höchstwahrscheinlich an den Konstrukten und nicht an den unterschiedlich positionierten synthetischen Introns (pers. Mitteilung von Dr. C.D.Knight). Denn auch durch das Kontrollkonstrukt *pT13d2* konnten keine stabilen Transformanten erhalten werden. Bei einem Vergleich zwischen den beiden Kontrollkonstrukten, fallen die unterschiedlichen Promotoren auf. Die Stärke des Promotors kann eventuell auch ein Grund dafür sein (pers. Mitteilung von Dr. C.D.Knight).

Weiterhin wurde in der stabil transformierten Mooskultur (Bar/*pBI22:23* und Nar/*pBI22:23*) aus der genomischen DNA im Agarosegel extrachromosomale Fragmente detektiert. Diese Fragmente wurden näher charakterisiert. Nach einer Eluierung der Banden aus dem Agarosegel, konnte eine Transformation über Elektroporation in *E.coli* durchgeführt werden. Nach einer Minipräparation der Plasmide, wurden im Agarosegel Banden detektiert. Diese Plasmide wurden durch unterschiedliche Restriktionsenzyme gespalten und eine Restriktionskarte erstellt. Das Plasmid *Bar/pBI221:23/4Kb* zeigte das identische Restriktionsmuster, welches ursprünglich in die Mooskultur transformiert wurde. Eine Southern-Analyse bestätigte dieses Ergebnis. Dieses war der Beweis, daß das Fragment – welches extrachromosomal in der unrestringierten DNA im Agarosegel lokalisiert war – sich um das Plasmid handelt. Die restlichen Fragmente, die ebenfalls aus dem Agarosegel eluiert wurden, zeigten unterschiedliche Restriktionsmuster. Das Plasmid *Bar/pBI221:23/2Kb* wies eine Größe von 8.900Kb auf, wobei das ursprüngliche Plasmid eine Größe von 6.986Kb hatte. Das Plasmid *Nar/pBI221:23/4Kb* und das Plasmid *Nar/pBI221:23/2Kb* wiesen eine Größe von 3.500Kb auf. Vermutlich entstand durch eine Duplikation und Deletion während der Rekombination der Plasmide diese Größen. Inwieweit welche Gene dupliziert oder deletiert wurden, konnte nicht genau bewiesen werden. Durch eine Southern-Analyse konnte keine Hybridisierung dieser Plasmide festgestellt werden d.h. das die Plasmide ein verändertes Hygromycinogen oder keines enthalten. Um eine nähere Aussage der Duplikation und der Deletion machen zu können, könnte eine Sequenzanalyse sehr hilfreich sein.

Literatur

- Abel W.O., Knebel W., Koop H.U., Marienfeld J.R., Quader H., Reski R., Schnepf E., Spörlein B. (1989). A cytokinin-sensitive mutant of the moss *Physcomitrella patens*, defective in chloroplast division. *Protoplasma* 152, 1-13.
- ten Asbroek A.L., Quellette M & Borst P. (1990). Targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene into the tubulin gene cluster of *Trypanosoma brucei*. *Nature* 348, 174-175
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1990). *Molekularbiologie der Zelle*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Allgood N.D. & Silhavy T.J. (1988). Illegitimate recombination in bacteria. Kucherlapati R. & Smith G.R. (Hrsg.). *Genetic recombination*. American Society of Microbiology, Washington D.C.
- Ashton N.W., & Cove D.J. (1977). The isolation and preliminary characterisation of auxotrophic mutants of the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics* 54, 87-95.
- Ashton N.W., Schulze A., Hall P., & Bandurski R.S. (1985). Estimation of indole-3-acetic acid in gametophytes of the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 164, 142-144.
- Ashton N.W., and Cove D.J. (1990). Mutants as tools for the analytical dissection of cell differentiation in *Physcomitrella patens* gametophytes. In *Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry*, R.N. Chopra and S.C. Bhatla, eds (CRP Press, Florida), 17-31.
- Ashton N.W., Champagne C.E.M., Weiler T.A. & Verkoczy L.K. (1994). Chromosomal and extrachromosomal genetic transformation in *Physcomitrella patens*. Dep. of Biology, University of Regina, Saskatoon S4S0A2, Canada
- Ayares D. Spencer J., Schwartz F., Morse B., Kucherlapati R., (1985). Homologous recombination between autonomously replication plasmid in mammalian cells. *Genetics* 111, 375-388.
- Bae Y.-S., Chiba M., Ohira M., Ikeda H., (1991). A shuttle vector for analysis of illegitimate recombination in mammalian cells: effects of DNA topoisomerase inhibitors on deletion frequency. *Gene* 101, 285-289.

- Baur M., Potrykus I., Paszkowski J., (1990). Intermolecular homologous recombination in plants. *Mol. Cell. Biol.* 10, 492-500.
- Beck E., Ludwig G., Auerswald A.E., Reiss B. & Schaller H. (1982). Nucleotid sequence and exact localisation of the neomycin phosphotransferase gene from transposon *Ins*. *Gene* 19, 327-336.
- Berg P. (1991). Reverse genetics: ist origins and prospects. *Bio/Technology* 9, 342-344.
- Bilang R., Lida S., Peterhans A. & Paszkowski J. (1991). The 3'-terminal region of the hygromycin-B-resistance gene is important, for its activity in *Escherichia coli* and *Nicotiana tabacum*. *Gene* 100, 247-250.
- Birnboim H.C. & Doly J., (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Research* 7, 1513.
- Boehm R., Mengle-Gaw L., Kees U.R., Spurr N., Lavenir U., Forster A. & Rabbits R.H., (1989). Alternat purine-pyrimidine tracs may promote chromosomal translocations seen in variety of human lymphoid tumours. *EMBO J.* 8, 2621-2631.
- Bollag R.J., Waldman A.S. & Liskay R.M. (1989). Homologous recombination in mammalian cells. *Annu. Rev. Genet.* 23, 199-225.
- Bolivar F., Rodriguez R., Greene P., Betlach M., Heyneker H., Boyer H., Crosa J. & Falkow S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles: A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.
- Bouffler, S., Silver A., Cox R., (1993). The role of DNA repeats and associated secondary structures in genomic instability and neoplasia. *BioEssays* 15, 409-412.
- Buerstedde J.M. & Takeda S. (1991). Increased ratio of gene targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* 67, 179-188.
- Burn J.M., Bagnell J. D., Metzger J.D., Dennis E.S. & Peacock W.J. (1993). DNA methylation, vernalisation and initiation of flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 287-299.
- Canning S. & Dryja T.P. (1989). Short direct repeats at the breakpoints of deletions of the retinoblastoma gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5044-5048.
- Capecchi M.R. (1989). The new mouse genetics: Altering the genome by gene tageting. *Trends Genet.* 5, 70-76.

- Chu G., Hayakawa H. & Berg P. (1987). Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res.* 15 (3), 1311-1326.
- Cohen S.N., Chang A.C. & Hsu L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation in *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69 (8), 2110-2114.
- Cove D.J. & Ashton, N.W. (1984). The hormonal regulation of gametophytic development in bryophytes. In *the experimental Biology of Bryophytes*, A.F. Dyer and J.G. Duckett, (eds.) (Academic Press), 177-201.
- Cove D.J. (1992). Regulation of development in the moss *Piscomitrella patens*. In *Development. The molecular Genetic Approach*, V.E.A. Russo, S. Brody, D. Cove and S. Ottolenghi, (eds.) (Springer Verlag, Berlin) 179-193.
- Craig N.L. (1988). The mechanism of conservative site specific recombination. *Annu. Rev. Genet.* 22, 77-105.
- Cruz A. & Beveley S.M. (1990). Gene replacement in parasitic protozoa *Nature* 348, 171-173.
- de Groot M.J.A., Offringa R., Does M.P., Hooykaas P.J.J. & van den Elzen P.J.M. (1992). The mechanisms of intermolecular homologous recombination in plants as studied with single- and double-stranded DNA molecules. *Nucl. Acids Res.* 20, 2785-2794.
- de Lozanne A. & Spudich J.A. (1987). Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 236, 1086-1091.
- Dellaporta S.L., Wood J. & Hicks J.B. (1983). A plant DNA Miniprepation Version II. *Plant Mol. Biol. Reporter* 4, 19-21.
- Doerfler W., Toth M., Kochanek S., Achten S., Freisem Rabien U., Behn-Krappa A., Oerend G. (1990). Eucaryotic DNA methylation: facts and problems. *FEBS* 268, 329-333.
- Dower W.J., Miller J.F. & Ragsdale C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids. Res.* 16 (13), 6127-6145.
- Drlica K. (1995). *DNA und Genklonierung*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 147-149.
- Ehrlich S.D. (1989). Illegitimate recombination in bacteria. In: Berg D.E. & Howe M.M., (Hrsg.) *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington D.C.

- Engels P. & Meyer P. (1992). Comparison of homologous recombination frequencies in somatic cells of *Petunia* and tobacco suggests two distinct recombination pathways. *The Plant Journal* 2, 59-67.
- Farabaugh P.J., Schmeissner U., Hofer M. & Miller J.H. (1978). Genetic studies of the lac repressor VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in lac I gene of *Escheria coli*. *J. Mol. Biol.* 126, 847-857.
- Fiedler S. & Wirth R. (1988). Transformation of bacteria with plasmid by electroporation. *Anal. Biochem.* 170, 38-44.
- Fotheringham S. & Holloman W.K. (1989). Cloning and disruption of *Ustilago maydis* genes. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4052-4055.
- Franklin N.C. (1971). Illegitimate recombination. Hershey A.D. (Hrsg.) *The Bacteriophage Lambda*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY.
- Franklin N.C. (1967). Extraordinary recombination events in *Escherichia coli*. Their independence of the rec^+ function. *Genetics* 55, 699-707.
- Fromm M., Taylor L.P. & Walbot V. (1985). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (17), 5824-5828.
- Gheysen G., Villarroel R. & van Montagu, M. (1991). Illegitimate recombination in Plants : a model for T-DNA integration. *Genes & Development* 5, 287-297.
- Giroux C.N. (1988). Chromosome synapsis and meiotic recombination. In: Kucherlapati R. & Smith R.G. (Hrsg.): *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Glasgow A.C., Hughes K.T. & Simon M.I. (1989). Bacterial invasion systems. In: Berg D.E., & Howe M.M. (Hrsg.): *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Grimm C. & Kohli J. (1988). Observation of integrative transformation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* 154, 97-100.
- Galaud J.P., Gasper T. & Boyer N. (1993). Effect of anti-DNA methylation drugs on growth, level of methylated DNA, peroxidase activity and ethylene production of *Bryonia dioica* internodes. *Physiol. Plant* 87, 528-534.
- Gruenbaum Y., Naveh-Manly T., Cedar H., Razin A. (1981): Sequence specificity of methylation in higher plants DNA. *Nature* 292, 860-862.

- Grüneberg R.** (1995). Untersuchungen zur homologen und illegitimen Rekombination im transienten System an *Nicotiana tabacum*, Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Hagemann R.** (1985). Allgemeine Genetik, 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids Molecular Biology 166, 557.
- Hastings P.J.** (1988). Conversion event in fungi. Kucherlapati R. & Smith G.R. (Hrsg). Genetic rekombination. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- HersHKovitz M., Gruenbaum Y., Renbaum R., Razin A., Loyter A.** (1990). Effects of CpG methylation on gene expression in transfected Plants protoplasts. Gene 94, 189-193.
- Hein T., Prezewozni T. & Schiedler O.** (1983). Culture and selection of somatic hybrids using an auxotrophic cell line. Theor. Appl. Genet. 64, 119-122.
- Hinnen A., Hicks J.B., Fink G.R.** (1978). Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929-1939.
- Holliday R.** (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. Genet. Res. 5, 282-304.
- Hörold R.J.** (1995) Verwendung synthetischer Intronsvektoren für Genexpressionsstudien in *Nicotiana tabacum L.* Doktorarbeit, Universität zu Köln.
- Hyrien O., Debatisse M., Buttin G. & de Saint Vincent, B.R.** (1987). A hotspot for novel amplification joints in a mosaic of Alu-like repeats and palindromic A- and T-rich DNA. EMBO J. 6, 2401-2408.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. & Bevan M.W.** (1987). Gus fusions: β -Glucoronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6, 3901-3907.
- Katinka M.D. & Bourgain, F.M.** (1992). Interstitial telomeres are hotspots for illegitimate recombination with DANN molecules injected into the macronucleus of *Paramecium primaurelia*. EMBO J. 11, 725-732.
- Kitamura Y., Naito A., Yoshikura H.** (1991). Illegitimate recombination in a bovine papillomavirus shuttle vektor: a high level of site specificity. Biochem. And Biophys. Res. Comm. 179, 251-258.

- Knight C. D., Futers T.S. & Cove D.J.** (1991). Genetic analysis of a mutant class of *Physcomitrella patens* in which the polarity of gravitropism is reversed. *Molecular and General Genetics* 230, 12-16.
- Knight C.D. & Cove D.J.** (1989). The genetic analysis of tropic responses. *Environ. Expt. Bot.* 29, 57-70.
- Knight C.D.** (1994). Studying plant development in mosses: the transgenic route. *Plant, Cell and Environment* 17, 669-674
- Knippers, R.** (1995). *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 383-391.
- Konopka A.K.** (1988). Compilation of DNA strand exchange sites for non-homologous recombination in somatic cells. *Nucl. Acids Res.* 16, 1739-1758.
- Kopriva S., Cossu R. & Bauwe H.** (1995). Alternative splicing results in two different transcripts for H-protein of the glycine cleavage system in the C4 species *Flaveria trinervia*, *Plant J.* 8 (3), 435-441.
- Kronstad J.W., Wang J., Covert S.F., Holden D.W., McKnight G.I. & Leong S.A.** (1989). Isolation of metabolic genes and demonstration of gene disruption in the phytopathogenic filamentous fungus *Ustilago maydis*. *Gene.* 79, 97-106.
- Lehrman M.A., Schneider W.J., Südhof T.C., Brown M.S., Goldstein J.L. & Russell D.W.** (1985). Mutation in LDL receptor: *Alu-Alu* recombination deletes exon encoding transmembrane and cytoplasmic domains. *Science* 227, 140-146.
- Lin F-L., Sperle K. & Sternberg N.** (1984). Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA and in the recombination process. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1020-1034.
- Lou H., McCullough A.J. & Schuler M.A.** (1993). 3' splice site selection in dicot plant nuclei is position dependent. *Mol. Cell. Biol.* 13 (8), 4485-4493.
- Lyznik L.A., McGee J.D., Tung P.T., Bennetzen J.L. & Hogges J.K.** (1991). Homologous recombination between plasmid DNA molecules in maize protoplasts. *Mol. Genet.* 230, 209-218.
- Maliga P., Breznowitz A. & Marton L.** (1973). Streptomycin resistant plants from callus cultures of tobacco. *Nature* 244, 29-30.
- Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook J.** (1982). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Bakkeren G., Crameri A., Angelis K., Redei G.P., Schell J., Hohn B. & Koncz C. (1991).** T-DNA intergration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J.* 10, 697-704.
- Meuth M. (1989).** Illegitimate recombination in mammalian cells. Berg D.E. & Howe M.M. (Hrsg.) *mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Meyer P., Walgenbach E., Bussmann K., Hombrecher G. & Saedler H. (1985).** Synchronized tobacco protoplasts are efficiently transformed by DNA. *Mol. Genet.* 201, 513-518.
- Miller J.F., Dower W.J. & Tompkins L.S. (1988).** High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 (3), 856-860.
- Milot E., Belmaaza A., Wallenburg J.C, Gusew N., Bradley N. & Chartrand P. (1992).** Chromosomal illegitimate recombination in mammalian cells is associated with intrinsically bent DNA elements. *EMBO J.* 11, 5063-5070.
- Nalbantoglu J., Hartley D., Phear G., Tear G. & Meuth M. (1986).** Spontaneous deletion formation at the part locus of hamster cells: the presents of short sequence homologies and dyad symmetries at deletion termini. *EMBO J.* 5, 1199-1204.
- Negrutiu I., Shillito, R.D., Potrykus G., Biasini G. & Sala F. (1987).** Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. I. Settings up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. *Plant Mol.* 8, 363-373.
- Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y. & Hofschneider P.H. (1982).** Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.*, 1 (7), 841-845.
- Norrande J., Kempe T. & Mesing J. (1983).** Construction of improved M13 Vectors using oligodesoxyribonukleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26, 101-106.
- Ohl S., Offringa R., van den Elzen P.J.M. & Hooykaas P.J.J. (1994).** Gene replacement in plants. In *Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants* (Paszkowski J. ed.). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 191-217.
- Orr-Weaver T.L., Szostak J.W. and Rothstein R.J. (1981).** Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6354-6358.

- Paietta J.V. & Marzluf G.A.** (1985). Gene disruption by transformation in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1554-1559.
- Palmgren G., Mattson O. & Okkels F.T.** (1993). Treatment of Agrobacterium or leaf disks with 5-azacytidine increases transgene expression.
- Peterhans A., Schlüpmann H., Basse C. & Paszkowski J.** (1990). Intrachromosomal recombination in plants. *EMBO J.* 9, 3437-3445.
- Porter T., Pennington S.L., Adair G.M., Naim R.S. & Wilson J. H.** (1990). A novel selection system for recombinational and mutational events within an intron of a eucaryotic gene. *Nucl. Acids Res.* 18, 5173-5180.
- Potter H., Weir L. & Leder P.** (1984). Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 81 (22), 7161-7165.
- Puchta H. & Hohn B.** (1991). A transient assay in plant cells reveals a positive correlation between extrachromosomal recombination rates and length of homologous overlap. *Nucl. Acids Res.* 18, 5173-5180.
- Puchta H., Kocher S. & Hohn B.** (1992). Extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cell is past and is not affected by CpG methylation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3372-3379.
- Puchta H. & Meyer P.** (1994). Substrate specificity of plant recombinase determined in extrachromosomal recombination system. Subtitle: Extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells. Paszkowski J. (Hrsg.). *Homologous recombination in plants*. Kluwer academic Publishers, Dordrecht.
- Reski R., & Abel W.O.** (1985). Induction of budding on chloronemata and coulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165, 354-358.
- Reski R., Abel W.O. & Svensson D.** (1986). Mutants of *Physcomitrella patens* sensitive to cytokinin. *Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg* 21, 127-138.
- Reski R.** (1990). Zell und molekularbiologische Untersuchungen der cytokinin induzierbaren Gewebedifferenzierungen und chloroplastenteilung bei *Physcomitrella patens* (Hedw.) BSG, Dissertation, Universität Hamburg.
- Roth D. & Wilson J.** (1988). Illegitimate recombination in mammalian cells. In: Kucherlapati R. & Smith G.R. (Hrsg.): genetic recombination. American Society for Microbiology, Washington D.C.

- Rothstein R.** (1991). Targeting, disruption, replacement and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol.* 194, 281-301.
- Rubnitz J. & Subramani S.** (1984). Rapid assay for extrachromosomal homologous recombination in monkey cells. *Mol. Cell. Biol.* 5, 529-537.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sancer A. & Sancer G.B.** (1988). DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 29-67.
- Sawahel W., Onde S., Knight C.D. & Cove D.J.** (1992). Transfer of foreign DNA into *Physcomitrella patens* protonemal tissue by using the gene gun. *Plant Molecular Biology Reporter* 10, 315-316.
- Schäfer D.G., Zryd J.P., Knight C.D. & Cove D.J.** (1991). Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics.* 226, 418-424.
- Schäfer D.G.** (1994). *Molecular Genetic Approaches to the Biology of the moss Pyscomitrella patens.* PhD Thesis, University of Lousanne, Switzerland.
- Schäfer D.G. & Zryd J.-P.** (1997). Efficient gene targeting in the moos *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* 11 (6) 1195-1206.
- Selker E.U.** (1990). DNA methylation and chromatin structur. A view from below. *TIBS* 15, 287-294.
- Shillito R.D., Saul M.W., Paszkowski J., Müller M. & Potrykus I.** (1985). High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio / Technology* 3, 1099-1103.
- Shiotani H. & Tsuge T.** (1995). Efficient gene targeting in the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *Mol. Gen. Genet.* 248, 142-150.
- Stry A. & Sarasin A.** (1992). Molecular analysis of DNA junctions produced by illegitimate recombination in human cells. *Nucl. Acids Res.* 20, 4268-4274.
- Struhl K.** (1983). The new yeast genetics. *Nature* 305, 391-397.
- Stryer L.** (1994). *Biochemie.* Aus den Amerikan. Übers. von Brigitte Pfeifer u. Johannes Guglielmi. – 2. Korr. Nachdruck 1994 der völlig neubearbeitete Aufl. 1990, - Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akad. Verlag, 1994.

- Subramani S. & Seaton B.L** (1988). Homologous recombination in mitotically dividing mammalian cells. Kucherlapati R. & Smith G.R. (Hrsg.). Genetic recombination. American Society of Microbiology, Washington D.C.
- Szostak J.W., Orr-Weaver T.L., Rothstein R.J. & Stahl F.W.** (1983). The Double-Strand-Break Repair Model for recombination. *Cell* 33, 25-35.
- Taketo A.** (1988). DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim. Biophys. Acta.* 949 (3), 318-324.
- Thacker J., Chalk J., Ganesh A. & North P.** (1992). A mechanism for deletion formation in DNA by human cell extracts. The involvement of short sequence repeats. *Nucl. Acids Res.* 20, 6183-6188.
- Timberlake W.E. & Marshall M.A.** (1989). Genetic engineering in filamentous fungi. *Science* 244, 1313-1317.
- Thompson J.F. & Landy A.** (1989). Regulation of bacterial phage Lambda site-specific recombination. Berg D.E. & Howe M.M. (Hrsg.). Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Tonegawa S.** (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Wake C.T., Vernaleone F. & Wilson J.H.** (1985). Topological requirements for homologous recombination among DNA molecules transfected into mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2080-2089.
- Wang, P.S. & Cove D.J.** (1989). Mosses-lower Plants with high potential. *Plants Today*, 2, 44-50.
- Watson J.C. & Thompson** (1986). Purification and restriction endonuclease analysis of plant nuclear DNA. *Methods enzymol.* 118, 57-75
- Watson J.C., Tooze J. & Kurtz D.T.** (1985). Rekombinierte DNA, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft m.b.H. & Co; Heidelberg
- Weber H., Ziechmann C. & Graessmann A.** (1990). In vitro DNA methylation inhibits gene expression in transgenic tobacco. *EMBO J.* , 4406-4415.
- Wiesbauer K., Herrero J.J. & Filipowicz W.** (1988). Nuclear pre-mRNA processing in plants: distinct modes of 3'-splice-site selection in plants and animals. *Mol. Cell. Biol.* 8 (5), 2042-2051.

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar bis September im Arbeitsbereich Zellbiologie (AG Reski) am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg durchgeführt. Ich möchte allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn PD Dr. Ralf Reski gilt meine besonderer Dank, für die Bereitstellung des Themas, dem ständigen Interesse mit wertvollen Hinweisen sowie die Möglichkeit meines sechs Monate langen Auslandsaufenthalts mit Stipendium.

Herrn Prof. Dr. W.O. Abel danke ich für die Bereitschaft der Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Tamara Kleber-Jahnke, Birgit Haderer, Dr. Sven Kruse, Gilbert Gorr und Rene Strepp möchte ich für die nette Zusammenarbeit, Hilfe und Unterstützung im Labor sowie gute Atmosphäre danken. Für das Sorgfältige und sehr schnelle Korrekturlesen bedanke ich mich bei Dr. Tamara Kleber-Jahnke. Für Hinweise im Zeichenprogramm danke ich Rene Strepp. Christa Adami danke ich für die Hilfe bei den Fotoarbeiten.

Prof. Dr. Cove, Dr. Celia Knight, Dr. Jesse Machuta und Bev danke ich für die Hilfe und Zusammenarbeit im Labor (Leeds). Dr. Sultan Bahadur und Andreas Müller danke ich für die Diskussion, Anregung und moralische Unterstützung im Labor.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, denen ich für die moralische Unterstützung im Leben sowie während des ganzen Studiums danken möchte.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Arbeit selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Hamburg

September 1997

N. 8.1
Necke Digital

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Arbeit selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Hamburg September 1997

N. Birgül
Necla Birgül