

Lehrstuhl für Genetik der  
Technischen Universität München

# **Erzeugung Markergen-freier Pflanzen durch Nutzung des $\gamma\delta$ Resolvase/*res* Rekombinationssystems**

Maya Khaliani

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl  
2. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann

Die Dissertation wurde am 22.08.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.11.2006 angenommen.

für Niniko

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Die Kartoffel.....	1
1.2. Die Kartoffelstärke.....	3
1.3. Die Gentechnik bei Pflanzen.....	5
1.4. Die Vermeidung von Markergenen.....	6
1.5. Die sequenzspezifische Rekombination.....	8
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	12
2.1. Materialien und Bezugsquellen.....	12
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....	12
2.1.2. Pflanzenmaterialien.....	13
2.1.3. Bakterien-Stämme.....	13
2.1.4. Anzucht der Bakterienstämme.....	13
2.1.5. Ausgangsplasmide.....	14
2.1.6. Plasmide aus dieser Arbeit.....	15
2.1.6.1. Plasmide für die Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase.....	15
2.1.6.2. Plasmide für die gerichtete Mutagenese.....	16
2.1.6.3. Plasmide für Herstellung das synthetische $\gamma\delta$ Resolvase Gen.....	17
2.1.6.4. Expressionsplasmide der $\gamma\delta$ Resolvase.....	18
2.1.6.5. Plasmide, die <i>res</i> -flankierte DNA-Sequenzen tragen.....	19
2.1.6.6. Plasmide für die Herstellung von <i>gus</i> - Reportergerkonstrukten mit <i>res</i> -Zielsequenzen.....	20
2.1.6.7. Plasmide für die Herstellung transgener Pflanzen.....	22
2.1.7. Primer.....	24
2.1.8. Medien und Lösungen für einzelne Arbeitsgänge.....	27
2.1.8.1. <i>E. coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Medien.....	27
2.1.8.2. Antibiotikastocklösungen.....	28
2.1.8.3. Lösungen für die Präparation und Transfektion von Kartoffelprotoplasten.....	29
2.1.8.4. Lösungen für die Southern blot-Analyse.....	30
2.1.8.5. Lösungen für die Regeneration von Protoplasten zu Kartoffelpflanzen.....	31
2.2. Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	32
2.2.1. Transformation und Herstellung von transformationskompetenten Bakterien ( <i>E. coli</i> , <i>A.</i> <i>tumefaciens</i> ).....	32

2.2.2. Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> .....	34
2.2.3. Agrobakterientransformation von Internodiensegmenten bei Kartoffeln.....	34
2.3. Präparation genomischer DNA aus Kartoffelpflanzen.....	35
2.3.1. Southern blot-Analyse.....	35
2.3.2. PCR.....	36
2.3.3. Sequenzierung.....	36
2.3.4. Sonden für die Southern blot-Analyse.....	37
2.4. Präparation und Transformation von Kartoffelprotoplasten.....	37
2.4.1. Präparation von Kartoffelprotoplasten.....	37
2.4.2. Transformation von Kartoffelprotoplasten modifiziert nach Bilanz et al., 1994.....	37
2.4.3. Histochemische GUS-Färbung.....	38
2.5. Regeneration von Protoplasten zu Kartoffelpflanzen.....	38
2.6. <i>In vitro</i> -Kultur von Kartoffelpflanzen.....	39
2.7. <i>In vitro</i> -Knollenbildung.....	39
2.8. Anlegen einer Dauerkultur.....	39
2.9. Kartoffel-Stärketest mit Lugol´s Lösung.....	40
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
3.1. Gensynthese des $\gamma\delta$ Resolvase/ <i>res</i> Systems.....	41
3.1.1. Entwurf einer $\gamma\delta$ Resolvase mit optimierter Basenpaarabfolge zur Anpassung der Kodonnutzung für Kartoffeln.....	41
3.1.2. Herstellung der Fragmente des $\gamma\delta$ Resolvase Gens.....	42
3.1.3. Herstellung von Genkonstrukten zur Expression der $\gamma\delta$ Resolvase in Kartoffel.....	44
3.1.4. Gezielte Mutagenese der $\gamma\delta$ Resolvase.....	45
3.1.5. Herstellung von <i>res</i> -flankierten DNA-Sequenzen.....	46
3.1.6. Herstellung von <i>gus</i> -Reportergenkonstrukten mit <i>res</i> -Zielsequenzen.....	47
3.2. Das transiente Testsystem in Kartoffelprotoplasten.....	48
3.3. Sequenzspezifische Rekombination in Kartoffelprotoplasten mit $\gamma\delta$ Resolvase.....	49
3.4. Erstellung von T-DNA Konstrukten zur anti-sense Hemmung von <i>GBSS</i> mit <i>res</i> -flankierten Markergensequenzen.....	52
3.4.1. pGRKR Plasmide.....	52
3.4.2. pRKRK Plasmide.....	53
3.5. Herstellung transgener <i>res</i> -haltiger Kartoffelpflanzen.....	54
3.5.1. Übertragung der T-DNA aus den Plasmiden pGRKR und pRKRK in das Kartoffelkultivar Walli.....	54
3.5.2. Analyse der putativen Transformanden.....	55
3.5.2.1. PCR Analyse.....	55
3.5.2.2. Southern blot-Analyse.....	56

3.5.2.3. Analyse der Stärkequalität im Jod-Stärke-Test.....	59
3.6. <i>res</i> -haltige T-DNA als Substrat der Rekombination durch die $\gamma\delta$ Resolvase.....	61
3.6.1. pGRKR Plasmide als episomale Substrate mit <i>res</i> -Sequenzen.....	61
3.6.2. Genomisch integrierte T-DNA mit <i>res</i> -Markergensequenzen als Ziel sequenzspezifischer Rekombination.....	63
3.6.3. Sequenzanalyse markerfreier <i>res</i> -Amplikons.....	64
3.7. Transiente Expression der $\gamma\delta$ Resolvase zur gezielten Entfernung von <i>res</i> -Markergensequenzen und Erzeugung markerfreier Pflanzen.....	66
3.8. Untersuchungen der Sensitivität von Kartoffelpflanzen gegenüber Kanamycin.....	66
3.9. Molekularbiologische Analyse von Regeneraten nach Behandlung mit $\gamma\delta$ Resolvase.....	68
3.9.1. PCR Analyse.....	68
3.9.2. Southern blot-Analyse.....	71
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>73</b>
4.1. Synthese des modifizierten $\gamma\delta$ Resolvase Gens.....	73
4.2. Transiente Transfektion der $\gamma\delta$ Resolvase in Kartoffelprotoplasten.....	74
4.3. Die <i>gus</i> -Reportergenkonstrukte mit <i>res</i> -Zielsequenzen.....	76
4.4. Die durch $\gamma\delta$ Resolvase vermittelte sequenzspezifische Rekombination auf Plasmiden und im Genom von Kartoffeln.....	78
4.5. Herstellung <i>res</i> -markerfreier Kartoffelpflanzen.....	80
4.5.1. Identifizierung <i>res</i> -markerfreie Kartoffelpflanzen.....	80
4.6. Bewertung der Biosicherheit unserer Pflanzen.....	86
4.6.1. Horizontaler Gentransfer durch Persistenz der Gene in der Umwelt.....	86
4.6.2. Vertikaler Gentransfer.....	90
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>92</b>
<b>6. Tabellen.....</b>	<b>94</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>102</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>112</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>113</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
<i>ArgE</i>	Phosphinotricin Deacetylase
bp	Basenpaar(e)
<i>bla</i>	Carbenicilin Resistenz Gen
C	Cytosin
ca	zirka
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP(s)	Desoxyribonukleintriphosphat(e)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eppi	Eppendorf-Tube
EtOH	Ethanol
et al.	et aliter; und andere (Autoren)
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
G	Guanin
Gus	$\beta$ -Glucuronidase
<i>gus</i>	$\beta$ -Glucuronidasegen
GFP	„green fluorescent protein“
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
l	Liter
M	molar
MeOH	Methanol
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute(n)
mM	millimolar
$\mu$	Mikro
NAA	$\alpha$ -Naphthyllessigsäure
<i>nptII</i>	Neomycinphosphotransferase II Gen
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei $x$ nm Wellenlänge
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol

Pellet	Zentrifugationssediment
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , lat.
P35S	CAMV-(“Cauliflower Mosaic Virus”) 35S-Promotor
PW <sub>x</sub>	Knollenspezifische Promotor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
R.T.	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde(n)
ST-DNA	„salmon testis DNA“
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat+Na <sub>2</sub> -EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Vol.	Volumen
U	Unit, enzymatische Aktivitätseinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute (Zentrifugationsgeschwindigkeit)
UV	Ultraviolettes Licht
Ü.N.	über Nacht
WT	Wildtyp
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-glucuronid

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Kartoffel

Die Heimat der Kartoffel liegt vermutlich im Gebiet von Peru und Bolivien. Die Inkas haben sie in den südamerikanischen Anden seit ca. 3000 Jahren vor Chr. kultiviert. Noch heute findet sich dort ein großes Kartoffelangebot - nicht nur was die Menge, sondern auch was die Vielfalt betrifft. 1532 wurde die Kartoffelpflanze von dem spanischen Seefahrer Castellano nach Spanien gebracht. Phillip II. von Spanien (1527-1598) verschenkte im Jahr 1565 die Kartoffel an den kranken Papst in Rom als Heilmittel. Im Jahr 1588 hat der Botaniker Carolus Clusius die ersten Kartoffelpflanzen in den kaiserlichen Garten in Wien eingepflanzt, aber als Zierpflanze. Dieser Botaniker schickte dann die Kartoffelpflanze auch an befreundete Kollegen in verschiedenen Ländern Europas. Nach England soll die Kartoffel der Sklavenhändler John Hawkins aus Santa Fe im Jahr 1565 eingeführt haben (Udelgard Körber-Grohne, 1995).

Es hat fast noch 200 Jahre gedauert, bis die Kartoffel in Europa wirtschaftliche Bedeutung als Lebensmittel gewann. In die deutsche Landwirtschaft wurde die Kartoffel durch die Politik Friedrich des Großen (1712-1787) eingeführt. Einer Anekdote gemäß befahl er während einer Hungersnot in der Nähe von Berlin den Kartoffelanbau. Die Felder wurde von Soldaten streng bewacht, vordergründig um Diebe abzuhalten. Friedrich zählte aber vielmehr auf die menschliche Neugier der Bauern, die dadurch angeregt königliche Knollen selber anbauen wollten (Udelgard Körber-Grohne, 1995).

Interessanterweise geht der Kartoffelanbau in Georgien auf Deutsche zurück: „Die Dörfer, die auf die linke Seite des Flusses – „Mtkwari“ (Tbilissi) sind, sind meistens von eingewanderten Deutschen aus Württemberg bewohnt. Die Georgier sollten diesen Deutschen für den Kartoffelanbau danken,“ schrieb der damalige französische Konsul in Georgien Gamba. Durch die Koalitionskriege und die Hegemonialpolitik von 1792 bis 1812 in Europa durch Napoleon Buonaparte wurden Deutsche gezwungen ihre Heimat zu verlassen und nach Süd-Osten zu wandern. So kamen sie im Herbst 1818 nach Georgien und brachten die Kartoffel mit (G. Badriscwili, 1963). Zur Zeit werden in Georgien 17 Speisekartoffelsorten angebaut (W. Zedginidze, pers. Mitteilung).

In Deutschland sind derzeit 209 verschiedene Kartoffelsorten zugelassen (Bundessortenamt, 2005). Neben Speisesorten spielen die sogenannten Industriekartoffeln zur Produktion von Stärke oder Bioalkohol eine wichtige Rolle.

In der Wissenschaft wird die Kartoffel als *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* bezeichnet und zu den Nachtschattengewächsen (*Solanaceae*) gezählt. Damit ist sie z.B. eine Verwandte der Tomate und Aubergine. Die Kartoffel ist nach Reis, Weizen und Mais das wichtigste Grundnahrungsmittel weltweit.

Nachdem in Europa die Bedeutung der Kartoffel für die Ernährung und damit auch ihr wirtschaftlicher Wert erkannt wurde, befasste man sich ab dem 19. Jahrhundert intensiv mit der Züchtung. Dabei werden Pollenkörner der Vaterpflanze künstlich auf die Narbe der Mutterpflanze übertragen. Es bilden sich Beeren, aus denen Samen isoliert werden. Eine Kreuzungspopulation wird durch den Anbau der Samen heutzutage in Gewächshäuser aufgebaut. Dabei spalten die genetisch fixierten Merkmale auf. Die Auswahl geeigneter Pflanzen erfolgt immer noch phänotypisch. Zunehmend werden jedoch molekulare Markertechniken wie z.B. AFLP (Vos et al., 1995) eingesetzt. Für die Züchtung einer neuartigen Sorte werden durchschnittlich zehn Jahre veranschlagt (Tiemann, 1997).

Die Ende der 70er Jahre entwickelte Haploidiezüchtung vereinfachte die Herstellung neuer Sorten. Es ist gelungen, aus tetraploiden Genotypen durch Bestäubung mit dem Pollen der Wildart *Solanum phureja* Diploide zu erzeugen (Hougas & Peloquin, 1957; Frandsen, 1967; Hermsen & Verdenius, 1973; Hutten et al., 1994). Da in einigen diploiden Linien Erbmaterial von *Solanum phureja* nachgewiesen wurde (Clulow et al., 1991), beruht vermutlich der Effekt der Reduktion des tetraploiden Chromosomensatzes auf ein diploides Niveau nicht allein auf parthenogenetischen Prozessen.

Während die heterozygoten Tetraploiden in Kreuzungsansätzen nach der Formel  $36^n$  ( $n$  = Anzahl der Gene eines Merkmals, ohne Kopplung) stark aufspalten (z.B.  $n=5$  führt zu 60.466.176 verschiedene Nachkommen), sind bei Diploiden nach der Formel  $4^n$  (z.B.  $n=5$  führt zu 1024 verschiedene Nachkommen) weniger komplexe Populationen zu erwarten. Wegen der geringeren Aufspaltung bei Kombination von Diploiden sollte die Pyramidisierung entscheidender Merkmale effizienter gelingen (A. Schwarzfischer, pers. Mitteilung).

Im Jahr 1978 wurde an der damaligen Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (LBP) mit der Haploidiezüchtung begonnen. Neben Ansätzen mit *Solanum phureja* wurden auch mit Hilfe der Technik der Antherenkultur (Nitsche & Wenzel, 1977) diploide Zuchtstämme erzeugt.

Die somatische Hybridisierung diploider Ausgangslinien durch Elektrofusion von Protoplasten führt zu tetraploiden Fusionshybriden. Pflanzen können damit gezielt kombiniert und ausgewählt werden (Wenzel et al., 1979). Die Vorteile der Protoplastenfusion sind die Möglichkeit einer gezielten Auswahl des Kern-Cytoplasmas unabhängig von der mütterlichen Vererbung, die Erweiterung der Kreuzungsprogramme unabhängig von der Fertilität der

Eltern, die Vermeidung meiotischer Prozesse zur Aufrechterhaltung polygener Merkmalskombinationen und die Unabhängigkeit von der saisonal bedingten Blütenbildung. Es wurden bisher 1832 verschiedene Fusionshybride der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) im Freiland getestet und einer züchterischen Evaluierung unterzogen. Ein Zuchtstamm durchlief bereits die Wertprüfung beim Bundessortenamt (A. Schwarzfischer, pers. Mitteilung).

## 1.2. Die Kartoffelstärke

Mit Zellulose ist die Stärke einer der bedeutenden, erneuerbaren Naturstoffe. Stärke wird in Pflanzen vor allem in den Wurzeln, Knollen und Samen gespeichert und als Energie- und Kohlenstoffspeicher genutzt. Gewonnen wird die Stärke industriell hauptsächlich aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen wie Mais, Weizen, Kartoffeln, Reis, Sorghum (Hirse) und Kassavawurzel (Tapioka).

Für den Menschen zeichnet sich die Stärke durch ihre vielseitige Verwendbarkeit, sowohl im Nahrungsmittelbereich als auch im Non-Food Bereich aus. Gerade deshalb besitzt die Stärke als nachwachsender Rohstoff ein großes Potential („Nachwachsende Rohstoffe“).

In Deutschland ist die Kartoffel neben Mais einer der wichtigsten Hauptstärkelieferanten und bringt die höchsten Stärkeerträge pro Flächeneinheit (Munzert et al., 1990). Die Kartoffelstärke wird bei der Herstellung von Papier und Pappen, sowie in der Textil- und Klebstoffindustrie verwendet. Die hohe Affinität zu Wasser legt auch die Verwendung von Stärke als gutes Adsorbtionsmaterial nahe (Königsberg, 1950; Wurzburg, 1960; Chel-Guerrero, 1998). Der Hauptanteil der Stärke wird im Nicht-Nahrungsbereich genutzt, z.B. in der Papierindustrie, aus den stärkehaltigen Abfallprodukten können durch fermentative Einwirkung einfache chemische Ausgangsstoffe, wie Ethanol, Glycerin, Aceton, Butanol, u.a. hergestellt werden. Die Stärke wird in der Lebensmittelindustrie wegen ihrer guten Verträglichkeit als Stabilisator für Emulsionen und in der Pharmaindustrie als Grundstoff für Kapselhüllen genutzt (Munzert et al., 1990). Sogar bei Erdölbohrungen wird die Stärke zum Abdichten von Bohrwänden, sowie zur Viskositätserhöhung von Transport- und Kühlwasser eingesetzt.

Das Biopolymer Stärke besteht aus zwei Komponenten: die linearkettige Amylose (1,4- $\alpha$ -glycosidische Verbindungen der Glucosemoleküle) und das hoch verzweigte Amylopektin (zusätzlich 1,6- $\alpha$ -glycosidische Verbindungen der Glucosemoleküle). In den Kartoffelknollen bayerischer Stärkesorten und Zuchtstämme variiert der Stärkegehalt zwischen 18 und 23 % (J. Schwarzfischer, pers. Mitteilung).

Das Molekulargewicht der Amylose liegt zwischen ca. 50.000 und 150.000 g/mol. Im Gegensatz dazu liegt das Molekulargewicht von Amylopektin mit  $1 \cdot 10^7$  bis  $7 \cdot 10^8$  g/mol wesentlich höher. Amylose ist in kaltem Wasser schlecht löslich. Ursache ist die Ausbildung einer Vielzahl von Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxylgruppen verschiedener Glucosemoleküle. Durch Erhitzen (bis 124°C) der Suspension kann eine klare, hoch viskose Lösung entstehen, die nach einiger Zeit wieder eintrübt (Burchard, 1985). Dieser Prozess wird als Retrogradation bezeichnet. Amylopektin - haltige Lösungen besitzen eine geringere Viskosität. Das Molekül weist im ungelösten Zustand, bedingt durch den hohen Grad an Verzweigung, eine zweidimensionale Struktur auf. In Lösung hingegen rollt sich das Makromolekül auf. Im Gegensatz zur Amylose sind die Lösungen von Amylopektin über einen sehr langen Zeitraum stabil und neigen nicht zur Retrogradation (Eberstein, 1980).

Die Eigenschaften von der Stärke hängen davon ab, in welchem Mengenverhältnis die beiden Stärke-Komponenten Amylose und Amylopektin vorhanden sind. In der Regel ist das Verhältnis in Pflanzen etwa 1:4 bis 1:5 (Amylose zu Amylopektin). Die Filmbildung wird besonders durch Amylose vermittelt. Die guten Kleistereigenschaften verdankt die Stärke dem Amylopektin ([www.biosicherheit.de/kartoffeln/30.dok.html](http://www.biosicherheit.de/kartoffeln/30.dok.html)).

Zu Beginn eines Veredelungsprozesses der Stärke zur Produktion eines Glucosepolymers mit Amylopektineigenschaften werden mit erheblichem technischem Aufwand und Energiebedarf chemische Modifikationen durchgeführt. Die „Inaktivierung“ der Amylose über Veresterung und Veretherung führt zudem zu einer hohen Abwasserbelastung. Bei einer mittelständischen Stärkefabrik fällt allein bei diesem Verfahren täglich soviel Abwasser wie in einer Kleinstadt mit 15.000 Einwohnern an (M. Müller, pers. Mitteilung). Wichtige Ziele der Züchtung sind daher die Verbesserung der Stärkequalität und die Veränderung des Amylose/Amylopektin Verhältnis in der Kartoffel (Smith & Martin, 1993).

Gentechnologische Methoden bieten in dieser Hinsicht eine Vielzahl von Ansätzen. Reine Amylopektinstärke kann schon heute direkt aus Amylose-freien Knollen transgener Kartoffeln isoliert werden. Für die Stärkefabriken entfallen damit Kosten und der Aufwand für die chemische Modifizierung und das Abwasseraufkommen wird deutlich reduziert. In der industriellen Praxis könnte Amylopektin aus transgenen Kartoffeln direkt ohne weitere Aufarbeitungsschritte zu Produktion von Spezialstärken eingesetzt werden (J. Mahl, pers. Mitteilung).

Die methodischen Ansätze zur Bildung von reiner Amylopektinstärke in den Kartoffelknollen basieren auf der Inhibierung des Gens der granulär gebundenen Stärkesynthase (*GBSS*) im Stärkestoffwechsel.

An der LfL wurde eine transgene Kartoffellinie (#1332) ohne Markergen erzeugt, deren *GBSS*-Genaktivität durch Einsatz eines 581 bp langen, in Antisense Orientierung vorliegenden genomischen *GBSS*-Genfragments (*asGBSS*) inhibiert wird. Die Stärke dieser

markerfreien Kartoffel besteht nahezu vollständig aus Amylopektin. Im Jod-Stärke-Test erscheinen natürliche Stärkekörner blau (Abb. 1a), während Stärke aus #1332 eine rötliche Färbereaktion zeigt (Abb. 1b).

Die Freisetzung der transgenen Kartoffellinie #1332 wurde im Jahr 2004 vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) bis 2013 genehmigt und wird seither von der LfL durchgeführt (M. Reichmann, pers. Mitteilung).

Bis Dezember 2004 wurden EU-weit 225 Freilandversuche mit transgenen Kartoffeln genehmigt, die meisten in Deutschland ([www.biosicherheit.de/kartoffeln/14.doku.html](http://www.biosicherheit.de/kartoffeln/14.doku.html)).

Die gentechnischen Veränderungen betreffen 54 % Stärkezusammensetzung, 11 % Virusresistenz, 10 % Pilzresistenz, 8 % Insektenresistenz, 7 % Herbizidresistenz und 10 % sonstige Veränderungen (Biologische Bundesanstalt, 2004). In allen Fällen werden Markergen-haltige Pflanzen angebaut.

a)



b)



**Abb. 1: Kartoffelstärkekörner im Jod-Stärke Test.**

Die Stärkekörner der Stärkesorte Walli erscheinen in Jod-Stärke Test blau (a). Dagegen zeigen die Stärkekörner der transgenen Kartoffellinie #1332 eine rote Färbung, die auf Amylopektin-haltige Stärke hinweist.

### 1.3. Die Gentechnik bei Pflanzen

Seit Mitte der 80er Jahre sind Gentransfermethoden für Pflanzen entwickelt worden, um durch die begrenzte Einführung von definiertem, genetischem Material Nutzpflanzen zu verbessern. Agrobakterien-vermittelter Gentransfer, die Anwendung einer Partikelkanone und die chemische oder elektrische Behandlung von Zellen zur Übertragung von DNA sind die Techniken der Wahl (Newel, 2000). In einem anschließenden Auswahlverfahren werden die transgenen Pflanzen isoliert. Die Ausprägung der Eigenschaften wird beeinflusst durch die Zellkultur (Peschke & Phillips, 1992; Kaeppler et al., 2000), den Integrationsort des Transgens im Zellkern (Meyer, 2000), die Anzahl der Transgene (Muskens et al., 2000; Matzke et al., 2000) und Mutationen (Battacharryya et al., 1994). Im Vergleich zu

Mikroorganismen sind die Transformationsraten von Pflanzen gering (Ow, 2002). Dieser Umstand macht die Verwendung von Markergenen zur sicheren Erkennung transgener Pflanzen notwendig (Hare & Chua, 2002).

Für die Herstellung transgener Pflanzen werden in der Regel selektierbare Markergene verwendet. Diese Gene verleihen entweder Resistenz gegenüber einem Antibiotikum oder Herbizid, das nichttransformierte Zellen abtötet, oder übertragen einen Stoffwechsellvorteil für die transformierten Zellen (Hare & Chua, 2002).

Zur Herstellung transgener Pflanzen wird oft das aus *E. coli* stammende Neomycinphosphotransferase II (*nptII*) Gen eingesetzt, das eine Resistenz gegenüber den Antibiotika Kanamycin und Neomycin vermittelt. Da es bereits zu einer natürlichen, nicht gentechnischen Übertragung der Kanamycin-Resistenz auf eine Vielzahl von Mikroorganismen gekommen ist, besitzt Kanamycin nahezu keine klinische Relevanz und erfüllt keine Funktion als Reserveantibiotikum. Aus technischer und wissenschaftlicher Sicht ist der Einsatz des weit verbreiteten *nptII* Gens zur Selektion transformierter Zellen daher unbedenklich (König, 2003).

In der Kerntransformation höherer Pflanzen wird häufig auch das aus *E. coli* Bakterien stammende  $\beta$ -Glucuronidase-Gen (*gus*) als Marker verwendet (Jefferson et al., 1987; Fromm et al., 1990; Meijer et al., 1991; Shen et al., 1993; Becker et al., 1994; Sawahel 2001). Das *gus*-Gen verleiht Resistenz gegenüber Cytokinin-Glycuroniden, fungiert aber hauptsächlich als sogenannter Farbmarker, da Gus Enzyme das farblose Ausgangssubstrat X-Gluc zu einem intensiv blauen Indigofarbstoff umsetzen.

Das aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* stammende „green fluorescent protein“ (GFP) ist ein weiterer beliebter „Farbmarker“ und kann mit Blau- oder UV- Licht zur Fluoreszenz führen. Diese Beobachtungen mit GFP sind am lebenden Organismus möglich (Prasher et al., 1995).

Auf den Einsatz von Markergenen zur Herstellung von transgenen Pflanzen kann bislang nur im Einzelfall verzichtet werden (de Vetten et al., 2003; M. Reichmann, pers. Mitteilung).

#### **1.4. Die Vermeidung von Markergenen**

Die biologische Sicherheit einer gentechnisch veränderten Nutzpflanze muss aufgrund gesetzlicher Vorgaben auf jeder Stufe der Produktentwicklung beachtet werden.

Nachdem selektierbare Markergene ihrer Funktion bei der Identifizierung transgener Zellen im Labor erfüllt haben, sind sie für die Pflanze nicht weiter nötig (Hare & Chua, 2002).

Markergen-freie Pflanzen sind in vielerlei Hinsicht sogar im Vorteil. Zum Einem könnten eine teure und zeitaufwendige Risikoabschätzung vermieden und dem Verbraucherwunsch auf Verzicht von Antibiotika-Markergenen entsprochen werden. Zum Anderen werden wiederholte Transformationsansätze zum Einbringen weiterer Resistenz- oder Qualitätsgene möglich und die Wahrscheinlichkeit der Geninaktivierung reduziert (Hohn et al., 2001). Die Dringlichkeit markerfreier Technologien wird vor allem in der Richtlinie der Europäischen Union 2001/18/EG verdeutlicht, die ab 2004 einen Verzicht von klinisch relevanten Antibiotika-Resistenzgenen bei kommerziellen Freisetzungen transgener Pflanzen forderte. Ein weiterer Grund für die Entfernung der „überflüssigen“ Markergene ist die Vermeidung von horizontalen oder vertikalen Gentransfer wichtiger Antibiotika-Resistenzgene. Es wurden mehrere Strategien entwickelt, um selektierbare Marker in transgenen Pflanzen zu vermeiden (Puchta, 2000; Hohn et al., 2001; Hare & Chua, 2002). Handelt es sich bei dem Zielorganismus um eine für Transformationstechniken gut zugängliche Nutzpflanze (z.B. Kartoffel), können Zielgenesequenzen schon heute ohne Markergene übertragen werden (de Vetten et al., 2003). Voraussetzung ist die Verfügbarkeit von optimierten Transformationstechniken im Hochdurchsatzverfahren. Zur Vermeidung von Antibiotika-Resistenzgenen können auch alternative Markergene zur Selektion eingesetzt werden (Negrotto et al., 2000; Kunkel et al., 1999; Andersson et al., 2003). Nachteile bei solchen Ansätzen sind, dass überflüssige Sequenzen in der transgenen Pflanze verbleiben und neue Markergene neu evaluiert werden müssen. Wenn es dagegen in (Co)-Transformationen gelingt, Ziel- und Selektionsgene ungekoppelt in ein Genom zu übertragen (Komari et al., 1996; Lu et al., 2001), können in nachfolgenden Rückkreuzungen Markergen-freie Pflanzen, die nur Zielgenesequenzen tragen, identifiziert werden. Dieses Vorgehen ist allerdings für Kartoffeln als vegetativ vermehrte Pflanze nicht relevant. Auch die Nutzung und Induktion der endogenen Systeme von Pflanzen zur homologen Rekombination kann zur Vermeidung von Markergenen beitragen (Zubko et al., 2000; Siebert & Puchta, 2002). Des weiteren besteht die Möglichkeit durch Einsatz spezieller Enzymsysteme wie Transposasen zur gezielten Veränderung der Erbsubstanz (Ebinuma et al., 1997; Osborne & Baker, 1995). In vielen Untersuchungen werden sequenzspezifische Rekombinationssysteme zur Entfernung von DNA-Segmenten aus einem Genom eingesetzt (Dale and Ow, 1991; Diaz et al., 2001; Hoa et al., 2002; Lorbach et al., 2000; O'Gorman et al., 1991). Um die Pflanzen nur bedarfsgerecht der Rekombinaseaktivität auszusetzen (Coppoolse et al., 2003), wurden transiente Expressionssysteme für molekulare Werkzeuge entwickelt (Baubonis & Sauer, 1993; Kopertekh et al., 2004; Vergunst & Hooykaas, 1998; Zuo et al., 2001). DNA-Moleküle werden nach Induktion der Enzymaktivität an definierten Sequenzmotiven geschnitten und wieder zu neuen Partnern verbunden, wie es z.B. bei der sequenzspezifischen Rekombination von *lox*-Sequenzen durch Cre Rekombinase der Fall ist (Abremski et al., 1983). Unerwünschte DNA-Abschnitte fallen weg. Besonders erfolgsversprechend ist die

Überprüfung der erfolgten Rekombination über negative Selektionsverfahren (Hare & Chua, 2002). Beispielsweise könnte *argE* (kodiert eine Deacetylase zur Aktivierung von N-Acetyl-Phosphinotricin und Bildung von Phosphinotricin als selektives Agens) zur Identifizierung Markergen-freier Pflanzen genutzt werden (Kriete et al., 1996).

## 1.5. Die sequenzspezifische Rekombination

Ein einfaches sequenzspezifisches Rekombinationssystem besteht aus zwei Erkennungsmotiven und einem Rekombinase Enzym, das die Rekombinationsreaktion an den Erkennungsmotiven katalysiert. Die Rekombinasen werden entsprechend ihrer Funktion und Aminosäuresequenz-Homologie der Integrase (Int)-Familie oder Resolvase (Res)-Familie zugewiesen (Sadowski, 1993).

Zur Int-Familie zählen z.B. die Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 (Gilbertson, 2003) und die FLP-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Kibly et al., 1995). Die Cre-Rekombinase bindet an eine 34 bp lange palindromische DNA-Sequenz (*lox*), die aus je 13 bp langen invertierten Nukleotidsequenzen und einem dazwischenliegenden 8 bp langen Abstand besteht (Hoess et al. 1985). Die Cre-Rekombinase katalysiert die Rekombinationsreaktionen zwischen zwei *lox*-Motiven (Abremski et al., 1983). Die Produkte der Reaktion sind abhängig von der Anordnung der *lox*-Motive zueinander. Bei in gleicher Richtung orientierten *lox*-Stellen erfolgt Deletion, während für Inversionsreaktionen gegenläufige *lox*-Sequenzen auf einem Molekül vorliegen müssen. Nicht gekoppelte *lox*-Stellen können zu Integrationen führen (Kilby et al., 1993). Der Mechanismus sequenzspezifischer Rekombination durch FLP ist vergleichbar (Kilby et al., 1993).

Zu der Res-Familie sind z.B. die Transposon-kodierte  $\gamma\delta$  Resolvase (Tn1000; Schwikardi & Dröge, 2001), die Gin-Rekombinase des Phagen Mu und die Plasmid-kodierte  $\beta$ -Rekombinase aus *Streptococcus pyogenes* (Diaz et al., 1999) zu zählen. Bisher wurde die Gin-Rekombinase in Pflanzen untersucht, jedoch führte nur die Expression eines hyperaktiven Gin-Proteins zu sequenzspezifischen Rekombinationen (Maeser & Kahmann 1991). Diese Gin Variante zeigte *in vivo* neue Eigenschaften (Klippel et al., 1988). Nicht nur Inversionen, auch Deletionen und intermolekulare Rekombinationen werden unabhängig von weiteren Faktoren durchgeführt. Die konstitutive Expression von Gin MV/KR führt zu Zellschäden in Pflanzen. Weitere Optimierungen sind daher nötig, um das Gin/*gix* Rekombinationssystem für die Entfernung von DNA-Abschnitten in Pflanzen zu etablieren.

Die Plasmid-kodierte  $\beta$ -Rekombinase katalysiert Rekombination zwischen zwei in gleicher Orientierung vorliegenden Rekombinationssequenzen in Zellkulturen der Maus. Das dazwischen liegende Segment kann ausgeschnitten aber auch invertiert werden (Diaz et al., 1999).

Das 183 Aminosäuren lange  $\gamma\delta$  Resolvase Polypeptid (Hatfull et al., 1987) besteht aus zwei strukturellen Polypeptidregion (Abdel-Meguid et al., 1984): dem N-Terminus (140 Aminosäuren), der eine katalytische Domäne enthält und für die Dimerisierung des  $\gamma\delta$  Resolvase Dimers zuständig ist (Hughes et al., 1990) und dem C-Terminus (43 Aminosäuren), der für Proteinwechselwirkungen zwischen  $\gamma\delta$  Resolvase Dimeren beim Aufbau der Synapse verantwortlich ist (Abdel-Meguid et al., 1984; Rimphanitchayakit & Grindley, 1990).

Die  $\gamma\delta$  Resolvase katalysiert Rekombination zwischen zwei in gleicher Orientierung vorliegenden Rekombinationsmotiven auf einem DNA Molekül. Die Rekombinationssequenzen werden mit *res* bezeichnet. *Res* besteht aus 145 Nukleotiden und ist, wie das Resolvasegen selbst, natürlicher Bestandteil eines Transposons. Die  $\gamma\delta$  Resolvase bindet an diese *res*-Sequenz, die drei Bindungsstellen (I-III) für die  $\gamma\delta$  Resolvasedimere enthält (Grindley et al., 1982; Rimphanitchayakit & Grindley, 1990). Jede Bindungsstelle besteht aus zwei 9 bp langen invertierten Nukleotidsequenzen und einem dazwischen liegenden Abstand z.B. 10 bp bei Site I, 16 bp bei Site II und 7 bp bei Site III (Hatfull & Grindley, 1987). Die zweite und dritte Bindungsstelle werden auch als Helfer-Sequenzen bezeichnet. Die Bindung von jeweils zwei Resolvasedimeren an jede dieser Sequenzen ist eine notwendige Voraussetzung zur Rekombination in Bakterien. Der Strangbruch erfolgt dabei im Zentrum der palindromischen Bindungsstelle I und wird von dem daran gebundenen  $\gamma\delta$  Resolvasedimer katalysiert (Arnold et al., 1999).

Resolvasen katalysieren Rekombination zwischen den Rekombinationssequenzen und vermitteln die Entfernung von dazwischenliegenden DNA Segmenten (Dröge, 2001). Inversionen oder Integrationen werden nicht vermittelt. Das ist der entscheidende Vorteil der  $\gamma\delta$  Resolvase gegenüber anderen Int-Rekombinasen, wie z.B. Cre und FLP.

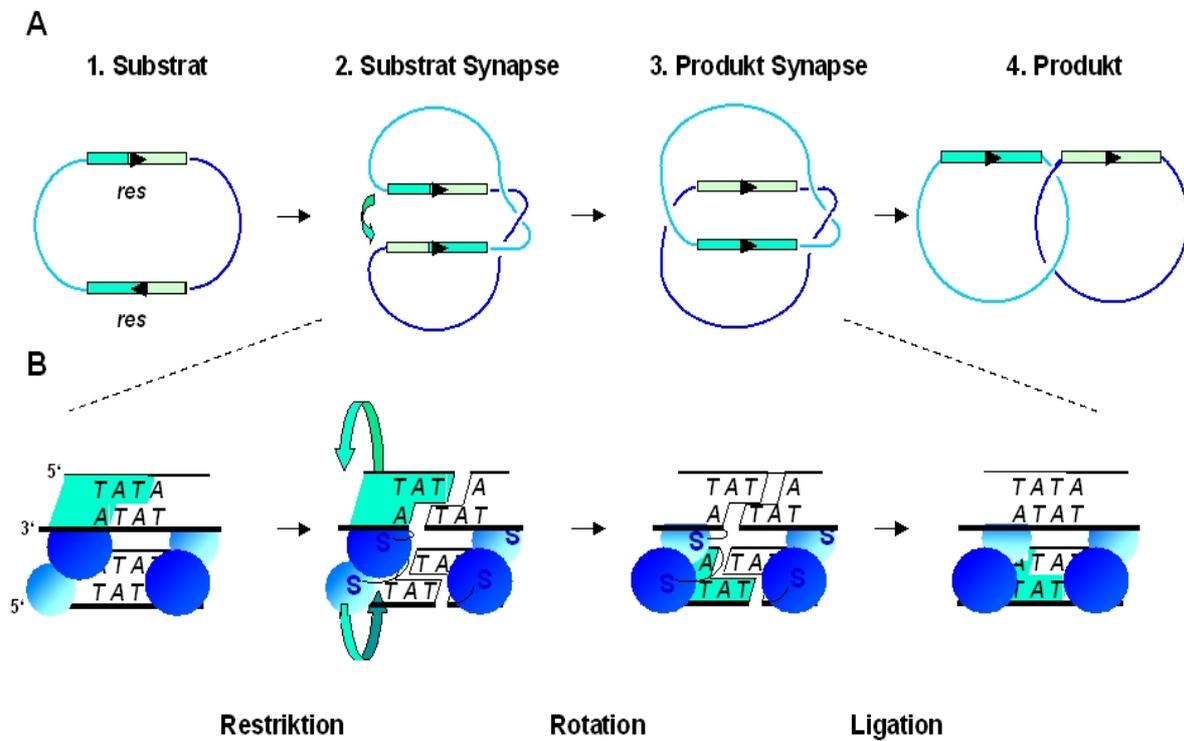
Der Mechanismus der Rekombinationsreaktion jeder Rekombinase-Familie weist deutliche Besonderheiten auf.

Int-Enzyme (z.B. Cre) schneiden die DNA-Doppelhelix an den entsprechenden Erkennungsstellen (z.B. *lox*) überlappend mit einem Abstand von 6 bp - 8 bp. Die intermediären, kovalenten Verbindungen bestehen bei Int-Enzymen aus 3'-Phosphodiestern an Tyrosinresten. Der Strangaustauschmechanismus ist bei Rekombinasen der Int-Familie durch eine Holliday Isomerisierung gekennzeichnet (Stark et al., 1992).

Res-Enzyme (z.B.  $\gamma\delta$  Resolvase) restringieren die DNA-Sequenzmotive (z.B. *res*) mit einem Überhang von 2 bp. Es wird im Synaptosom ein konservierter Serinrest über eine 5'-Phosphodiesterbrücke mit der DNA verbunden. Die dreidimensionale Struktur von *res*-DNA Komplexen lässt auf einen sequenziellen Einzelstrang-Restriktionsmechanismus schließen (Yang & Steitz, 1995). Die Bildung eines synaptischen Komplexes für die Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvasen ist eine notwendige Voraussetzung (Dröge & Cozzarelli, 1989). Drei Dimere der  $\gamma\delta$  Resolvase binden mit vergleichbaren Affinitäten an *res* Site I, II und III. Der Komplex wird als Resolvosom bezeichnet (Salvo & Grindley, 1988). Zwei Resolvosome bilden einen übergeordneten Komplex aus 12 Resolvase Molekülen und zwei *res*-Stellen (Abb. 2A; 3; Dröge, 2001) der als Synaptosom bezeichnet wird und durch eine zufällige Kollision der Resolvosome entsteht (Dröge & Cozzarelli, 1989; Abb. 2A; 2). Es wird im Synaptosom an beiden *res* Sites I die DNA-Strang genau an einer TATA-Sequenz gespalten und restringiert (Abb. 2b). Möglicherweise wird die anschließende Rekombination durch einen Rotationsmechanismus innerhalb des Synaptosoms erreicht (Produkt Synapse, Abb. 2A; 3; Yang & Steitz, 1995). Der Strangaustausch führt zur Entfernung der *res*-flankierten DNA-Sequenz unter Beibehaltung einer *res*-Erkennungsstelle (Schwikardi & Dröge, 2001).

Für die erfolgreiche Rekombination in Bakterien durch die  $\gamma\delta$  Resolvase ist eine superspiralisierte DNA notwendig. Mitglieder der Res-Familie benötigen die negative Torsionsspannung (DNA Supercoiling) des DNA-Substrats, um Rekombination zwischen zwei *res* katalysieren zu können (Dröge, 2001). Es wurde aber in der Arbeit von Schwikardi & Dröge et al., 2000, 2001 schon gezeigt, dass die  $\gamma\delta$  Resolvasen E124Q und E102YE124Q Rekombinationsreaktionen auf linearen Substraten katalysieren können.

Für die Rekombination benötigt die  $\gamma\delta$  Resolvase keine weiteren akzessorischen Proteine (Reed, 1981) und ist daher grundsätzlich zur gezielten Modifikation von DNA auch außerhalb von *E. coli* geeignet.



**Abb. 2: Modell der  $\gamma\delta$  Resolvase vermittelten sequenzspezifischen Rekombination.**

Das Substrat (A 1.) trägt zwei in gleicher Orientierung vorliegende *res*-Sequenzen (grün gezeichnete Vierecke, die Orientierung ist mit kleinen schwarzen Pfeilen angegeben), die mit jeweils 6 Resolvase Dimeren (nicht gezeigt) eine Substrat - Synapse (A 2.) bilden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung von  $\gamma\delta$  Resolvase Proteinen verzichtet. Während der sequenzspezifischen Rekombination werden die DNA Stränge rotiert. In der Produkt Synapse (A 3.) liegen 2 Endprodukte (A,4.) mit jeweils einer *res* Site vor.

Restriktion, Rotation und Ligation sind im Detail dargestellt (B). Der Schnitt der DNA durch Resolvase erfolgt an der TATA-Sequenz von *res* Site I. Vermutlich führt eine Rotationsreaktion in der Synapse mit anschließender Ligation der DNA zu den Rekombinationsprodukten

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1. Materialien und Bezugsquellen**

#### **2.1.1. Chemikalien und Reagenzien**

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden bei folgenden Firmen bezogen: J.T. Baker, BioRad, Carl Roth, Serva, Sigma-Aldrich, Eppendorf, Roche, Biozym.

Enzyme für DNA-Restriktion und Modifikation wurden von New England BioLabs, Roche geliefert.

Für Standard-PCR's wurden Laborpräparationen der Taq DNA-Polymerase verwendet (Lfl, IPZ3b). Die PCR für Klonierungszwecke erfolgte mit Pfu-Polymerase (Stratagene), die Ligationen erfolgten mit T4-DNA Ligase (New England BioLabs).

Die für PCR-Reaktionen und Sequenzierungen eingesetzte Oligonukleotide wurde von der Firma MWG Biotech hergestellt.

Es wurden folgende Membranen und Filterpapiere verwendet: Dialysefilter VSPW 0,025 µm (Millipore), Gel Blot Papier GB005 und GB002 (Schleicher & Schuell), Membranfilter NC 45 (Schleicher & Schuell) für die Protoplastenfixierung, Membrane Hybond N+ (Amersham), Millex (Millipore), Papierfilter 595 (Schleicher & Schuell), Sterilfilter 0,22 µm (Millipore), Sterivex (Millipore).

Verwendete Kits: NEBlot Phototope Kit (New England BioLabs), Phototope-Star Detection Kit (New England BioLabs), Plasmid Maxi Kits (Qiagen), TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, Jet Sorb (Genomed) und Qiaex II (Qiagen) zur DNA Reinigung aus Agarosegel, Jet Quick Säule (Genomed) zur Aufreinigung von DNA, Jet Star (Genomed).

Sonstige Materialien und Geräte: AlphaImager MultiImage™ Light Cabinet (Alpha Innotech), Autoklav 400EC RO/RG (H+P), Belly Dancer BDRAA220S (Stovall), Color Camera 431-145 AxioCam MRC (Zeiss), ChemiImager™ 5500 (Alpha Innotech), Gelkammern 40-1214 (PeQLab), Gene Pulser® (BioRad), Hybridisierungsofen OVNA2205 (Stovall), Lichtmikroskop 451485 Axioskop (Zeiss), PCR Maschine PTC-100™ (MJ Research), Photometer- Ultraspec 3000 (Pharmacia Biotech), Roto-Shake Genie (Scientific Industries), Sterilbank (retec® clean air System GmbH), Spannungsgerät PowerPac 200 (BioRad),



Rifampicin	(100 mg/ml),
Gentamycin	(40 µg/ml),
Kanamycin	(25 µg/ml),
Streptomycin	(300 µg/ml),
Spektinomycin	(100 µg/ml ).

Die Bestimmung der Zelldichte einer Kultur erfolgte photometrisch bei 600 nm.

### 2.1.5. Ausgangsplasmide

pCR4-TOPO	(Invitrogen) Allgemeine Klonierungsvektor, der für die Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität verwendet wurde.
pSL1180	(Pharmacia) Allgemeiner Klonierungsvektor.
pUC19	(Yanisch-Perron et. al.,1985) Allgemeiner Klonierungsvektor.
pCre#15	(LFL, IPZ3b) Ausgangsvektor für $\gamma\delta$ Resolvase Expressionskonstrukte, trägt unter der Kontrolle eines 35S Promotors den Leserahmen der Rekombinase Cre.
pFLP#2	(LFL, IPZ3b) als Kontrollplasmid und zu Klonierungen von Zielpasmiden verwendet, enthält FLP Rekombinase unter der Kontrolle 35S Promotors und ist begrenzt durch einer 35S Terminator.
pgusNX#15	(LFL, IPZ3b) enthält unter der Kontrolle eines agrobakteriellen Promotors der Mannopinsynthese des <i>gus</i> -Reporter gen, begrenzt durch Tnos Terminator-Sequenzen. 5' zu Pmas sind 198 bp 5' Tocs Terminator-Sequenzen lokalisiert.
pLH9500	(L. Hausmann) T-DNA Vektor, enthält eine Kanamycin Resistenzkassette unter der Kontrolle eines 35S Promotors.
pLH9000	(L. Hausmann) Entspricht pLH9500 mit inverser Orientierung des Polylinkers.
pMFLp9-1#2	(LFL, IPZ3b) T-DNA Vektor, trägt unter der Kontrolle des GBSS <i>asGBSS</i> -Sequenzen begrenzt durch einen T35S Terminatorbereich.
pMFLp9-2#48	(LFL, IPZ3b) entspricht dem pMFLp9-1#2 T-DNA Vektor mit inverser Orientierung der funktionellen Elemente der T-DNA.

pMFlp9-3#26	(LFL, IPZ3b) entspricht dem pMFlp9-1#2 T-DNA Vektor, wobei in Intron1 eine <i>MluI</i> und eine <i>XbaI</i> Schnittstelle eingefügt worden ist.
pMFlp9-4#7	(LFL, IPZ3b) entspricht dem pMFlp9-2#48 T-DNA Vektor, wobei in Intron1 eine <i>MluI</i> und eine <i>XbaI</i> Schnittstelle eingefügt worden ist.
pNT150	(R. Kunze) zu Klonierungen verwendet, enthält unter der Kontrolle eines agrobakteriellen Promotors der Mannopinsynthese das <i>gus</i> -Reportergergen.
pTopo-argE-1#3	(LFL, IPZ3b) pCR4-TOPO-Derivat, enthält <i>argE</i> -Reportergergen.
pTopo-argE-2#2	(LFL, IPZ3b) analoges Plasmid zu pTopo-argE-1#3 mit inverser Orientierung des Reportergergens.
p2FRTdeltagus	(LFL, IPZ3b) trägt unter der Kontrolle eines agrobakteriellen Promotors der Mannopinsynthese das <i>gus</i> -Reportergergen. Zwischen dem <i>gus</i> -Reportergergen und Promotor sind zwei in gleiche Orientierung vorliegende <i>FRT</i> -Sequenzen lokalisiert.
p2loxgus	(LFL, IPZ3b) entspricht dem Plasmid p2FRTdeltagus, wobei an Stelle <i>FRT</i> -Sequenzen zwei <i>lox</i> -Sequenzen lokalisiert sind.

## 2.1.6. Plasmide aus dieser Arbeit

### 2.1.6.1. Plasmide für die Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase

pTopo-gd12 trägt eine 114 bp lange  $\gamma\delta$  Resolvase-Sequenzen aus gensynthetischen Ansätzen mit den Oligonukleotiden gd1 und gd2, die dem Bereich 1-114 bp der synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase entsprechen. Die 120 bp großen Produkte aus den gensynthetischen Ansätzen wurden in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Hier kann das Fragment gd12 in zwei verschiedenen Orientierung inseriert werden: Orientierung 1 bedeutet, dass der 3'-Bereich des gd12 Genfragments am lac Promotor liegt; bei der Orientierung 2 liegt der 5'-Bereich des gd12 Genfragments am lac Promotor. Es wurde weiter mit pTopo-gd12-2#1 gearbeitet (Abb. 4).

pTopo-gd34 trägt 122 bp  $\gamma\delta$  Resolvase-Sequenzen aus gensynthetischen Ansätzen mit den Oligonukleotide gd3 und gd4, die dem Bereich 115-266 bp der synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase entsprechen. Die 128 bp großen Produkte aus den gensynthetischen Ansätzen wurden in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Es wurde weiter mit pTopo-gd34-2#1 gearbeitet (Abb. 4). Das Genfragment ist in Orientierung 2.

pTopo-gd51rv trägt 130 bp  $\gamma\delta$  Resolvase-Sequenzen aus PCR Ansätzen mit den Oligonukleotide gd51 und rev, das Plasmid pTopo-gd56-2#6 (siehe unten) diene dabei als Matrize. Dieses Fragment entspricht dem Bereich 227-397 bp der synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase. Die 246 bp großen Produkte aus den PCR Ansätzen wurden in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Es wurde weiter mit pTopo-gd51rv-2#21 gearbeitet (Abb. 4). Das Genfragment ist in Orientierung 2.

pTopo-gd718 trägt 92 bp  $\gamma\delta$  Resolvase-Sequenzen aus gensynthetischen Ansätzen mit den Oligonukleotide gd71 und gd8, die dem Bereich 398-484 bp der synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase entsprechen. Die 92 bp großen Produkte aus den gensynthetischen Ansätzen wurden in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Es wurde weiter mit pTopo-gd718-1#22 gearbeitet (Abb. 4). Das Genfragment ist in Orientierung 1.

pTopo-gd910 trägt 126 bp  $\gamma\delta$  Resolvase-Sequenzen aus gensynthetischen Ansätzen mit den Oligonukleotide gd9 und gd10, die dem Bereich 485-611 bp der synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase entsprechen. Die 126 bp großen Produkte aus den gensynthetischen Ansätzen wurden in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Es wurde weiter mit pTopo-gd910-2#19 gearbeitet (Abb. 4). Das Genfragment ist in Orientierung 2.

#### **2.1.6.2. Plasmide für die gerichtete Mutagenese**

pTopo-gd56 entspricht pTopo-gd51rv, wobei die  $\gamma\delta$  Resolvase-Sequenzen eine Mutation an Position E102Y enthalten. Es wurde erzeugt aus gensynthetischen Ansätzen mit den Oligonukleotide gd5 und gd6. Die 136 bp großen Produkte wurden in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Es wurde weiter mit pTopo-gd56-2#6 gearbeitet. Das Genstück ist in Orientierung 2. Das bedeutet, dass der 5'-Bereich des gd56 Genfragments am lac Promotor liegt. Bei Orientierung 1 würde der 3'-Bereich des gd56 Genfragments am lac Promotor liegen.

pTopo-gd5262 entspricht pTopo-gd56, wobei  $\gamma\delta$  Resolvase-Sequenzen eine Mutation M103I tragen. Die 136 bp großen Produkte aus den PCR Ansätzen wurden in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Es wurde weiter mit pTopo-gd5262-1#2 gearbeitet. Das Genfragment liegt in Orientierung 1 vor.

pTopo-gd78 entspricht pTopo-gd718, wobei dieser Subklon die Mutation E124K enthält. Es wurde aus gensynthetischen Ansätzen mit den Oligonukleotide gd7 und gd8 erzeugt. Die 92 bp großen Produkte aus den gensynthetischen Ansätzen wurden in den Vektor pCR4-TOPO eingefügt. Es wurde weiter mit pTopo-gd78-2#13 gearbeitet. Das Genfragment besitzt die Orientierung 2.

pTopo-gd728 entspricht pTopo-gd78, wobei gezielt die Mutation an Position E124Q der  $\gamma\delta$  Resolvase eingeführt wurde. Die 92 bp großen Produkte aus den PCR Ansätzen wurden in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Es wurde mit pTopo-gd728-1#9 weiter gearbeitet. Das Genfragment ist in Orientierung 1.

### 2.1.6.3. Plasmide für Herstellung des synthetischen $\gamma\delta$ Resolvase Gen

p176 beinhaltet den 3' Bereich der synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase. Dieses Plasmid wurde in einer Ligationreaktion mit einem 3264 bp *PstI/BamHI*-Fragment aus pSL1180, mit dem 86 bp *BamHI/ScaI*-Fragment aus pTopo-gd78-2#13 und mit dem 126 bp *ScaI/PstI*-Fragment aus pTopo-gd910-2#19 erzeugt. Es wurde weiter mit p176#7 gearbeitet.

p1761 entspricht dem p176 Plasmid, wobei an Stelle des 86 bp *BamHI/ScaI*-Fragments aus pTopo-gd78-2#13 das 86 bp *BamHI/ScaI*-Fragment aus pTopo-gd718-1#22 eingesetzt wurde. Es wurde weiter mit p1761#9 gearbeitet.

p1762 entspricht dem p176 Plasmid, wobei an Stelle des 86 bp *BamHI/ScaI*-Fragments aus pTopo-gd78-2#13 das 86 bp *BamHI/ScaI*-Fragment aus pTopo-gd728-1#9 eingesetzt wurde. Es wurde weiter mit p1762#18 gearbeitet.

p2345 beinhaltet den 5' Bereich der synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase. Dieses Plasmid wurde in einer Ligationreaktion mit einem 3267 bp *BamHI/NotI*-Fragment aus pSL1180, mit dem 133 bp *NotI/HinDIII*-Fragment aus pTopo-gd12-2#1, mit dem 122 bp *HinDIII/MfeI*-Fragment aus pTopo-gd34-2#1 und mit dem 130 bp *MfeI/BamHI*-Fragment aus pTopo-gd56-2#6 erzeugt. Es wurde weiter mit p2345#61 gearbeitet.

p2345-1 entspricht p2345, wobei an Stelle des 130 bp *MfeI/BamHI*-Fragments aus pTopo-gd56-2#6 das 130 bp *MfeI/BamHI*-Fragment aus pTopo-gd51rv-2#21 eingesetzt wurde. Es wurde weiter mit p2345-1#8 gearbeitet.

p2345-2 entspricht p2345, wobei an Stelle des 130 bp *MfeI/BamHI*-Fragments aus pTopo-gd56-2#6 das 130 bp *MfeI/BamHI*-Fragment aus pTopo-gd5262#2 eingesetzt wurde. Es wurde weiter mit p2345-2#28 gearbeitet.

#### 2.1.6.4. Expressionsplasmide der $\gamma\delta$ Resolvase

$\text{p}\gamma\delta$  ist das Expressionsplasmid der  $\gamma\delta$  Resolvase mit modifizierten Kodons. An Position E102 wurde anstelle von Glutaminsäure (E) der Aminosäurerest Asparaginsäure (D) eingeführt. Davon abgesehen entspricht die Aminosäureabfolge der ursprünglichen Aminosäureabfolge dem Genbanknummer AP001918 (Broom et al., 1995). Dieses Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion mit einem 3775 bp *NcoI/XbaI* Fragment aus pCre#15, mit dem 77 bp *XbaI/PstI* Fragment aus pSL1180, mit dem 366 bp *BamHI/NcoI* Fragment aus p2345-1#8 und mit dem 212 bp *PstI/BamHI* Fragment aus p1761#9 erzeugt. Es wurde weiter mit  $\text{p}\gamma\delta\#28$  gearbeitet.

$\text{p}\gamma\delta\text{E102Y}$  ist ein Expressionsplasmid der  $\gamma\delta$  Resolvase. Der Leserahmen der  $\gamma\delta$  Resolvase kodiert für ein Protein mit einer Punktmutation E102Y und befindet sich unter der Kontrolle eines 35S Promotors. Die Aminosäureabfolge entspricht ansonst der Genbank Zugangsnummer: AP001918, Broom et al., 1995. Diese Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion mit einem 3775 bp *NcoI/XbaI* Fragment aus pCre#15, mit dem 77 bp *XbaI/PstI* Fragment aus pSL1180, mit dem 212 bp *PstI/BamHI* Fragment aus p1761#9 und mit dem 366 bp *BamHI/NcoI* Fragment aus p2345#61 erzeugt. Es wurde weiter mit  $\text{p}\gamma\delta\text{E102Y}\#8$  gearbeitet.

$\text{p}\gamma\delta\text{E102YE124Q}$  ist ein Expressionsplasmid der  $\gamma\delta$  Resolvase. Im Leserahmen des von der  $\gamma\delta$  Resolvase kodierten Proteins liegen die zwei Punktmutationen E102Y und E124Q vor. Dieses Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion mit einem 3775 bp *NcoI/XbaI* Fragment aus pCre#15, mit dem 77 bp *XbaI/PstI* Fragment aus pSL1180, mit dem 366 bp *BamHI/NcoI*-Fragment aus p2345#61 und mit dem 212 bp *PstI/BamHI* Fragment aus p1762#18 erzeugt. Es wurde weiter mit  $\text{p}\gamma\delta\text{E102YE124Q}\#29$  gearbeitet.

$\text{p}\gamma\delta\text{E102YE124K}$  ist ein Expressionsplasmid der  $\gamma\delta$  Resolvase. Im Leserahmen des von der  $\gamma\delta$  Resolvase kodierten Proteins sind zwei Punktmutationen: E102Y und E124K. Diese Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion mit einem 3775 bp *NcoI/XbaI* Fragment aus pCre#15, mit dem 77 bp *XbaI/PstI* Fragment aus pSL1180, mit dem 212 bp *PstI/BamHI* Fragment aus p176#7 und mit dem 366 bp *BamHI/NcoI* Fragment aus p2345#61 erzeugt. Es wurde weiter mit  $\text{p}\gamma\delta\text{E102YE124K}\#1$  gearbeitet.

$\text{p}\gamma\delta\text{E102DE124K}$  ist ein Expressionsplasmid der  $\gamma\delta$  Resolvase. In den Leserahmen des von der  $\gamma\delta$  Resolvase kodierten Proteins wurden zwei Punktmutationen E102D und E124K eingeführt. Dieses Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion mit einem 3775 bp *NcoI/XbaI* Fragment aus pCre#15, mit dem 77 bp *XbaI/PstI* Fragment aus pSL1180, mit dem 212 bp *PstI/BamHI* Fragment aus p176#7 und mit dem 366 bp *BamHI/NcoI* Fragment aus p2345-1#8 erzeugt. Es wurde weiter mit  $\text{p}\gamma\delta\text{E102DE124K}\#3$  gearbeitet.

$\gamma\delta$ E102DE124Q ist ein Expressionsplasmid der  $\gamma\delta$  Resolvase. Im Leserahmen des von der  $\gamma\delta$  Resolvase kodierten Proteins wurden zwei Punktmutationen E102D und E124Q eingeführt. Dieses Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion mit einem 3775 bp *NcoI/XbaI* Fragment aus pCre#15, mit dem 77 bp *XbaI/PstI* Fragment aus pSL1180, mit dem 212 bp *PstI/BamHI* Fragment aus p1762#18 und mit dem 366 bp *BamHI/NcoI* Fragment aus p2345-1#8 erzeugt. Es wurde weiter mit  $\gamma\delta$ E102DE124Q#71 gearbeitet.

$\gamma\delta$ M103I ist ein Expressionsplasmid der  $\gamma\delta$  Resolvase. Im Leserahmen des von der  $\gamma\delta$  Resolvase kodierten Proteins liegt die Punktmutation M103I. Dieses Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion mit einem 3775 bp *NcoI/XbaI* Fragment aus pCre#15, mit dem 77 bp *XbaI/PstI* Fragment aus pSL1180, mit dem 366 bp *BamHI/NcoI* Fragment aus p2345-2#28, mit dem 212 bp *PstI/BamHI* Fragment aus p1761#9 hergestellt. Es wurde weiter mit  $\gamma\delta$ M103I#39 gearbeitet.

$\gamma\delta$ M103IE124K ist ein Expressionsplasmid der  $\gamma\delta$  Resolvase. In den Leserahmen des von der  $\gamma\delta$  Resolvase kodierten Proteins wurden zwei Punktmutationen M103I und E124K eingeführt. Dieses Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion mit einem 3775 bp *NcoI/XbaI* Fragment aus pCre#15, mit dem 77 bp *XbaI/PstI* Fragment aus pSL1180, mit dem 366 bp *BamHI/NcoI* Fragment aus p2345-2#28 und mit dem 212 bp *PstI/BamHI* Fragment aus p176#7 erzeugt. Es wurde weiter mit  $\gamma\delta$ M103IE124K#2 gearbeitet.

$\gamma\delta$ M103IE124Q ist ein Expressionsplasmid der  $\gamma\delta$  Resolvase, Im Leserahmen des von der  $\gamma\delta$  Resolvase kodierten Proteins sind zwei Punktmutationen: M103I und E124Q. Dieses Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion mit einem 3775 bp *NcoI/XbaI* Fragment aus pCre#15, mit dem 77 bp *XbaI/PstI* Fragment aus pSL1180, mit dem 366 bp *BamHI/NcoI*-Fragment aus p2345-2#28 und mit dem 212 bp *PstI/BamHI* Fragment aus p1762#18 angefertigt. Es wurde weiter mit  $\gamma\delta$ M103IE124Q#58 gearbeitet.

#### **2.1.6.5. Plasmide, die *res*-flankierte DNA-Sequenzen tragen**

pTopo-res12 trägt 114 bp *res*-Sequenzen aus gensynthetischen Ansätzen mit den Oligonukleotiden res1 und res2. Die 138 bp großen Produkte wurden in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Es wurde weiter mit pTopo-res12-1#1 gearbeitet (Abb. 6). Das *res*-Sequenz ist in Orientierung 1, das bedeutet, dass der 3'-Bereich des res12 Gens am lac Promotor liegt, bei der Orientierung 2 liegt der 5'-Bereich des res12 Gens am lac Promotor.

pTopo-res34 trägt 28 bp *res*-Sequenzen der Site I aus gensynthetischen Ansätzen mit Oligonukleotiden res3 und res4. Die 100 bp großen Produkte wurden in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Es wurde weiter mit pTopo-res34-2#17 gearbeitet (Abb. 6). Die *res*-Sequenz liegt in Orientierung 2 vor.

pTopo-rfo1 und trägt 1092 bp *res* (28 bp) flankierte *nptII*-Sequenzen des 5' Bereiches aus gensynthetischen Ansätzen mit der Oligonukleotide neo2 und rfo1. Das 1092 bp große Produkt aus den gensynthetischen Ansätzen wurde in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Es wurde weiter mit pTopo-rfo1-2#8 gearbeitet. Die *res* (28 bp) flankierten *nptII*-Sequenzen sind in Orientierung 2.

pTopo-rfo2 trägt 1039 bp *res* (28 bp) flankierte *nptII*-Sequenzen des 3' Bereiches aus gensynthetischen Ansätzen mit der Oligonukleotide neo1 und rfo2. Das 1045 bp große Produkt wurde in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Es wurde weiter mit pTopo-rfo2-2#31 gearbeitet. Die *res* (28 bp) flankierten *nptII*-Sequenzen liegen in Orientierung 2 vor.

#### **2.1.6.6. Plasmide für die Herstellung von *gus*-Reporterengenkonstrukten mit *res*-Zielsequenzen**

pRr1 trägt zwei *res*-Sequenzen mit gleicher Orientierung, dabei liegt am 3' Bereich des 35S Promotors eine 114 bp *res*-Sequenz und eine 28 bp *res*-Sequenz am 5' Bereich des *gus*-Reportergens. Dieses Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion mit einem *EcoRI/NdeI* Fragment (3217 bp) des pSL1180 Klonierungsvektors, mit dem 88 bp *NdeI/NsiI* Fragment aus pTopo-res34-2#17, mit dem 134 bp *EcoRI/SmaI* Fragment aus pTopo-res12-1#1 und mit dem 117 bp *EcoRI/PstI* Fragment aus pSL1180 erzeugt. Es wurde weiter mit pRr1#24 gearbeitet.

pRr2 entspricht dem Plasmid pRr1, wobei am 3' Bereich des 35S Promotors eine 28 bp *res*-Sequenz und am 5' Bereich vom *gus*-Reportergens eine 114 bp *res*-Sequenz liegt. Dieses Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion mit einem *EcoRI/NotI* Fragment (3209 bp) des pSL1180 Plasmids, mit dem 141 bp *PstI/NotI* Fragment aus pTopo-res12-1#1, mit dem 117 bp *EcoRI/PstI* Fragment aus pSL1180 und mit dem 91 bp *EcoRI/SmaI* Fragment aus pTopo-res34-2#17 erzeugt. Es wurde weiter mit pRr2#3 gearbeitet.

pRR3 entspricht dem Plasmid pRr2, wobei sowohl am 3' Bereich vom 35S Promotors als auch am 5' Bereich vom *gus*-Reportergens eine 114 bp *res*-Sequenz liegt. Dafür wurde an Stelle des 91 bp *EcoRI/SmaI* Fragments aus pTopo-res34-2#17 das 134 bp *EcoRI/SmaI* Fragment aus pTopo-res12-1#1 eingesetzt. Es wurde weiter mit pRR3#54 gearbeitet.

prR4 entspricht dem Plasmid pRr1. Am 3' Bereich vom 35S Promotors und am 5' Bereich vom *gus*-Reportergens liegen 28 bp *res*-Sequenzen. Dazu wurde an Stelle des 134 bp *EcoRI/SmaI* Fragments aus pTopo-res12-1#1 das 91 bp *EcoRI/SmaI* Fragment aus pTopo-res34-2#17 eingesetzt. Es wurde weiter mit prR4#36 gearbeitet.

pRr1gus basiert auf pRr1 Plasmid. *res*-Sequenzen sind zwischen 35S Promotor und *gus*-Reportergen lokalisiert und sollen so die Expression von *gus*-Gen verhindern. Dieses Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion mit einem *XmaI/BglIII* (5884 bp) Fragment des p2loxgus Plasmids, dem 2198 bp *EcoRI/BglIII* Fragment aus p2FRTΔgus und mit dem 330 bp *XmaI/EcoRI* Fragment aus pRr1#24 erzeugt. Es wurde weiter mit pRr1gus#8 gearbeitet.

prR2gus basiert auf pRr2 Plasmid. *res*-Sequenzen sind wie bei pRr1gus zwischen 35S Promotor und *gus*-Gen lokalisiert. An Stelle des 330 bp *XmaI/EcoRI* Fragments aus pRr1#24 wurde ein 338 bp *EcoRI/XmaI* Fragment aus prR2#3 in die Ligationsreaktion, die sonst der von pRr1gus entspricht, eingesetzt. Es wurde weiter mit prR2gus#31 gearbeitet.

prR4gus basiert auf prR4. Die Zusammensetzung der Fragmente entspricht pRR3gus, mit der Ausnahme, dass an Stelle des 337 bp *XmaI/EcoRI* Fragments aus pRR3#54 ein 291 bp *EcoRI/XmaI* Fragment aus prR4#36 eingesetzt wurde. Es wurde weiter mit prR4gus#89 gearbeitet.

pRxr1gus entspricht dem Plasmid pRr1gus, wobei dieses Plasmid zusätzlich zwischen dem 35S Promotor und dem *gus*-Reportergen eine 2,1 kb DNA-Sequenz trägt. Diese Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion erzeugt mit einem 5209 bp *BamHI/EcoRI* Fragment aus prR4gus#89, mit dem 2205 bp *EcoRI/XbaI* Fragment aus pRr1gus, mit dem 2177 bp *XbaI/PstI* Fragment aus pFLP und mit dem 636 bp *NsiI/BamHI* Fragment aus pRr1gus. Es wurde weiter mit pRxr1gus#52 gearbeitet.

prxR2gus1 entspricht dem Plasmid prR2gus mit einem zusätzlichen 2,1 kb Fragment zwischen Promotor und Reportergen. Es wurde in einer Ligationsreaktion erzeugt, mit einem 8183 bp *BglIII/XbaI* aus prxR3gus#3, mit dem 2289 bp *BglIII/PstI* Fragment aus prR2gus#31 und mit 776 bp *PstI/XbaI* Fragment aus pSL1180. Es wurde weiter mit prxR2gus1#2 gearbeitet.

pRxr3gus entspricht dem Plasmid pRR3gus mit einem zusätzlichen 2,1 kb Fragment zwischen Promotor und Reportergen. Diese Plasmid wurde in einer Ligationsreaktion erzeugt, mit einem 5209 bp *BamHI/EcoRI* Fragment aus prR4gus#89, mit dem 676 bp *BamHI/XbaI* Fragment aus pRr1gus, mit dem 2262 bp *EcoRI/PstI* Fragment aus prR2gus#31 und mit dem 2177 bp *XbaI/PstI* Fragment aus pFLP. Es wurde weiter mit pRxr3gus#3 gearbeitet.

prxr4gus#31 entspricht dem Plasmid prr4gus mit einem zusätzlichen 2,1 kb Fragment zwischen Promotor und Reportergen. Dieses Plasmid besteht aus einem 5209 bp *Bam*HI/*Eco*RI Fragment aus prr4gus#89, verbunden mit dem 2205 bp *Eco*RI/*Xba*I Fragment aus pRr1gus, dem 2177 bp *Xba*I/*Pst*I Fragment aus pFLP und dem 597 bp *Bam*HI/*Pst*I Fragment aus prR2gus#31. Es wurde weiter mit prxr4gus#31 gearbeitet.

### 2.1.6.7. Plasmide für die Herstellung transgener Pflanzen

pGRKR3 ist ein T-DNA Plasmid und trägt eine im Intron 1 des *GBSS*-Gens lokalisierte *res*-Markergen-kassette. In Kartoffelpflanzen können damit *asGBSS*-Sequenzen übertragen werden, die zu einer posttranskriptionalen Hemmung der granulär gebundenen Stärkesynthase führen. An der linken Grenzsequenzen der T-DNA (LB) befindet sich eine *asGBSS*-Sequenz. Am 3' Ende der *asGBSS*-Sequenz liegt in 5'→3' Orientierung eine *res*-flankierte Markergen-kassette, an der rechten Grenzsequenzen der T-DNA (RB) ist der *GBSS*-Promotor (PW<sub>x</sub>) lokalisiert. Das Plasmid pGRKR3 wurde in einer Ligationreaktion mit dem 6524 bp *Mlu*I/*Sgr*AI Fragment aus pMFlp9-3#26, mit dem 3009 bp *Sgr*AI/*Xba*I Fragment aus pMFlp9-3#26, mit dem 863 bp *Xba*I/*Pst*I Fragment aus pTopo-rfo2-2#31 und mit dem 656 bp *Pst*I/*Mlu*I Fragment aus pTopo-rfo1-2#8 erzeugt. Es wurde weiter mit pGRKR3#26 gearbeitet (Abb. 9)

pGRKR5 entspricht dem Plasmid pGRKR3 mit einer 3'→5' Orientierung der *res*-Markergen-kassette. An Stelle des 6524 bp *Mlu*I/*Sgr*AI Fragments aus pMFlp9-3#26 wurde ein 6514 bp *Xba*I/*Sgr*AI Fragment aus pMFlp9-3#26 und an Stelle des 3009 bp *Sgr*AI/*Xba*I Fragments aus pMFlp9-3#26 ein 2999 bp *Mlu*I/*Sgr*AI Fragment aus pMFlp9-3#26 eingeführt. Es wurde weiter mit pGRKR5#1 gearbeitet (Abb. 9).

pGRKR6 entspricht dem Plasmid pGRKR3, hier liegt an der RB in 3'→5' Orientierung die *asGBSS*-Sequenz und an der LB der PW<sub>x</sub>. Die *res*-Markergen-kassette liegt in 5'→3' Orientierung zur *asGBSS*-Sequenz. An Stelle des 6524 bp *Mlu*I/*Sgr*AI Fragments aus pMFlp9-3#26 wurde ein 6556 bp *Xba*I/*Sgr*AI Fragment aus pMFlp9-4#72 und an Stelle des 3009 bp *Sgr*AI/*Xba*I Fragments aus pMFlp9-3#26 ein 2988 bp *Sgr*AI/*Mlu*I Fragment aus pMFlp9-4#72 eingeführt. Es wurde weiter mit pGRKR6#39 gearbeitet (Abb. 9).

pGRKR4 entspricht dem Plasmid pGRKR6, mit einer *res*-Markergen-kassette, die in 3'→5' Orientierung vorliegt. An Stelle des 6556 bp *Xba*I/*Sgr*AI Fragments aus pMFlp9-4#72 wurde ein 6546 bp *Mlu*I/*Sgr*AI Fragment aus pMFlp9-4#72 und an Stelle des 2988 bp *Sgr*AI/*Mlu*I Fragments aus pMFlp9-4#72 ein 2979 bp *Sgr*AI/*Xba*I Fragment aus pMFlp9-4#72 eingeführt. Es wurde weiter mit pGRKR4#13 gearbeitet (Abb. 9).

pSL-rfo1-2 trägt den 3' Bereich von *res* (28 bp) flankierten *nptII*-Sequenzen. Das Plasmid wurde in einer Ligationreaktion mit einem 3366 bp *MfeI/SphI* Fragment aus pSL1180 und mit dem 1020 bp *SphI/EcoRI* Fragment aus pTopo-rfo1-2#8 erzeugt. Es wurde weiter mit pSL-rfo1-2#2 gearbeitet.

pRKR1 ist ein T-DNA Plasmid und trägt eine an der LB lokalisierte *res*-Markergenkassette, die in 5'→3' Orientierung vorliegt. Die asGBSS-Sequenzen befinden sich am 3' Ende der *res*-Markergenkassette in gegenläufiger Orientierung und führen zu einer posttranskriptionalen Hemmung der granulär gebundenen Stärkesynthese. Dieses Plasmid wurde in einer Ligationreaktion mit einem 7467 bp *EcoRI/SgrAI* Fragment aus pMFlp9-1#2, mit dem 2025 bp *BamHI/SgrAI* Fragment aus pMFlp9-1#2, mit dem 875 bp *EcoRI/PstI* Fragment aus pTopo-rfo2-2#31 und mit dem 665 bp *PstI/BamHI* Fragment aus pSL-rfo1-2#2 erzeugt. Es wurde weiter mit pRKR1#4 gearbeitet (Abb. 10).

pRKR2 entspricht dem pRKR1 Plasmid, wobei die Markergenkassette in umgekehrter Orientierung vorliegt. An Stelle des 7467 bp *EcoRI/SgrAI* Fragments aus pMFlp9-1#2 wurde ein 7485 bp *SgrAI/BamHI* Fragment aus pMFlp9-1#2 und an Stelle des 2025 bp *BamHI/SgrAI* Fragments aus pMFlp9-1#2 wurde ein 2043 bp *SgrAI/EcoRI* Fragment aus pMFlp9-1#2 eingeführt. Es wurde weiter mit pRKR2#5 gearbeitet (Abb. 10).

pRKR3 entspricht dem pRKR1 Plasmid, mit asGBSS-Sequenzen in 5'→3' Orientierung. An Stelle des 7467 bp *EcoRI/SgrAI* Fragments aus pMFlp9-1#2 wurde ein 7792 bp *MfeI/SgrAI* Fragment aus pMFlp9-2#48 und an Stelle des 2025 bp *BamHI/SgrAI* Fragments aus pMFlp9-1#2 wurde ein 2025 bp *SgrAI/BamHI* Fragment aus pMFlp9-2#48 eingeführt. Es wurde weiter mit pRKR3#15 gearbeitet (Abb. 10).

pRKR4 entspricht dem Plasmid pRKR3, wobei die *res*-Markergenkassette in 3'→5' Orientierung vorliegt. An Stelle des 7792 bp *MfeI/SgrAI* Fragments aus pMFlp9-2#48 wurde ein 7497 bp *BamHI/SgrAI* Fragment aus pMFlp9-2#48 und an Stelle des 2025 bp *SgrAI/BamHI* Fragments aus pMFlp9-2#48 wurde ein 1730 bp *SgrAI/MfeI* Fragment aus pMFlp9-2#48 eingeführt. Es wurde weiter mit pRKR4#10 gearbeitet (Abb. 10).

## 2.1.7. Primer

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Primer:

Name	bp	Sequenz (5'→3')	Applikation
gbss1	20	TCC TGA GGG ATA CGC AGA AC	GBSS- Genfragmente
gbss2	21	GGT CAA TTT CAG TTT CGG CAC	GBSS- Genfragmente
gbss3	23	AGT ATG GGC TCA CTG TAA CCA CC	GBSS- Genfragmente
gbss4	24	GAA GTC AAT GTA CCA GTC CAG AGG	GBSS- Genfragmente
gbss5	22	CCC AAG CAT CTT TGT ATT GGT C	GBSS- Genfragmente
gbss6	30	GTT TGT ATC CTG ATT ACT CTG TCA ACA GCC	GBSS- Genfragmente
gbss7	34	AAT CAA TTT CTG TTT TGT TTT TGT TCA TCT GTA G	GBSS- Genfragmente
gbss8	27	CAT TTC CTG ATT CAA GAA TGT GAT CCG	GBSS- Genfragmente
ag1+	25	GAC ACG TGT CAC TGA AAC CTG CTA C	GBSS- Genfragmente
ag1-	24	GCA TCA CAG CTT CAC ACC ACT TTG	GBSS- Genfragmente
ag2+	25	GAA CCA TGC ATC TCA ATC TTA ATA C	GBSS- Genfragmente
ag2-	22	CAC CCA AGA TGG CAT CCA GAA C	GBSS- Genfragmente
neo1	20	TGA ACA AGA TGG ATT GCA CG	<i>nptII</i> -Primer Gensynthese der <i>res</i> - flankierte <i>nptII</i> - Sequenzen
neo2	20	TCG ATG AAT CCA GAA AAG CG	<i>nptII</i> -Primer Gensynthese der <i>res</i> - flankierte <i>nptII</i> - Sequenzen
neo3	24	GCG TGC AAT CCA TCT TGT TCA ATC	<i>nptII</i> -Primer
35-2	24	CTC CAC TGA CGT AAG GGA TGA CGC	<i>nptII</i> -Primer
gd1	70	CCA TGG GAA GAC TTT TTG GAT ATG CTA GAG TTT CTA CTT CTC AAC AAT CTC TTG ATA TTC AAG TTA GAG C	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase

gd2	70	AAG CTT TAT CAG TAA AAA TTC TAT TAG CCT TAA CTC CAG CAT CCT TAA GTG CTC TAA CTT GAA TAT CAA G	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase
gd3	74	AAG CTT CTG GAT CTT CTT CTG ATA GAA AGG GAC TTG ATC TTC TTA GAA TGA AGG TTG AAG AAG GAG ATG TTA TT	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase
gd4	74	CAA TTG AAT CAT ATC AGC AGT ATC TCT TCC AAG TCT ATC CAA CTT CTT AAC AAG AAT AAC ATC TCC TTC TTC AA	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase
gd5	78	CAA TTG ATT AAG GAA TTT GAT GCT CAA GGA GTT TCT ATT AGA TTT ATT GAT GAT GGA ATT TCT ACT GAT GGA TAC ATG	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase
gd6	78	GGA TCC TTT GTC TTT CAG CTT GAG CAA CAG CAG AAA GAA TAG TAA CAA CCA TCT TTC CCA TGT ATC CAT CAG TAG AAA	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase
gd7	57	GGA TCC TCA AGA GAA CTA ATG AAG GAA GAC AAG AAG CTA TGG CTA AGG GAG TTG TTT	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase
gd8	57	AGT ACT GCA TCT CTA TCA ATC TTT CTC TTT CTT CCA AAA ACA ACT CCC TTA GCC ATA	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase
gd9	64	AGT ACT TAA TAT GTG GCA ACA AGG ACT TGG AGC TTC TCA TAT TTC TAA GAC TAT GAA CAT TGC T	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase
gd10	64	AGA TCT TAA TTA GAT TCA TTA ATA ACC TTA TAA ACA GTT GAT CTA GCA ATG TTC ATA GTC TTA G	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase
gd51	78	CAA TTG ATT AAG GAA TTT GAT GCT CAA GGA GTT TCT ATT AGA TTT ATT GAT GAT GGA ATT TCT ACT GAT GGA GAT ATG	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase
gd52	78	CAA TTG ATT AAG GAA TTT GAT GCT CAA GGA GTT TCT ATT AGA TTT ATT GAT GAT GGA ATT TCT ACT GAT GGA GAT ATT	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase

rev	78	CAA TTG ATT AAG GAA TTT GAT GCT CAA GGA GTT TCT ATT AGA TTT ATT GAT GAT GGA ATT TCT ACT GAT GGA GAA ATG	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase
gd62	78	GGA TCC TTT GTC TTT CAG CTT GAG CAA CAG CAG AAA GAA TAG TAA CAA CCA TCT TTC CAA TAT CTC CAT CAG TAG AAA	Gensynthese der $\gamma\delta$ Resolvase
gd71	57	GGA TCC TCG AAA GAA CTA ATG AAG GAA GAC AAG AAG CTA TGG CTA AGG GAG TTG TTT	Gensynthese der gd Resolvase
gd72	57	GGA TCC TCC AAA GAA CTA ATG AAG GAA GAC AAG AAG CTA TGG CTA AGG GAG TTG TTT	Gensynthese der gd Resolvase
res1	79	GAA TTC CTG CAG CGT CCG AAA TAT TAT AAA TTA TCG CAC ACA TAA AAA GCA TGC TGT TAA TGT GTC TAT TAA ATC GAT T	Gensynthese von <i>res</i> -Sequenzen (114 bp)
res2	79	CCC GGG ATG CAT TGT ATC CTA AAT CAA ATA TCG GAC AAG CAG TGT CTG TTA TAA CAA AAA ATC GAT TTA ATA GAC ACA T	Gensynthese von <i>res</i> -Sequenzen (114 bp)
res3	60	GCA TGC ATG GCG CGC CTC TAG AGG TAC CGC GGC CGC CGT CCG AAA TAT TAT AAA TTA TCG	Gensynthese von <i>res</i> -Sequenzen (28 bp)
res4	60	CCA TGG ACA TAT GCC CGG GCT GCA GCT AGT CAC TTA TGT GCG ATA ATT TAT AAT ATT TCG	Gensynthese von <i>res</i> -Sequenzen (28 bp)
rfo1	60	ACG CGT TGT GCG ATA ATT TAT AAT ATT TCG GAC GAC ATG GTG GAG CAC GAC ACT CTC GTC	Gensynthese von <i>res</i> -Site I (28 bp)
rfo2	61	TCT AGA CGT CCG AAA TAT TAT AAA TTA TCG CAC ATG CAG GTC ACT GGA TTT TGG TTT TAG G	Gensynthese von <i>res</i> -Site I (28 bp)

## 2.1.8. Medien und Lösungen für einzelne Arbeitsgänge

### 2.1.8.1. *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens* Medien

<u><i>LB-Agar</i></u>		<u><i>SOC Medium</i></u>	
1,0 % (w/v)	Tryptone Peptone	2 %	Tryptone
0,5 % (w/v)	Yeast Extract	0,5 %	Yeast Extract
0,5 % (w/v)	NaCl	10 mM	NaCl
1,5 % (w/v)	Agar	2,5 mM	KCl
		10 mM	MgSO <sub>4</sub>
		10 mM	MgCl <sub>2</sub>
		20 mM	Glucose
<u><i>RF1</i></u>		<u><i>RF2</i></u>	
50 mM	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	10 mM	0,5 M MOPS
100 mM	1,0 M RbCl <sub>2</sub>	10 mM	1,0 M RbCl <sub>2</sub>
10 mM	1,0 M CaCl <sub>2</sub>	75 mM	1,0 M CaCl <sub>2</sub>
30 mM	1,0 M KAc	15,0 % (v/v)	99,9 % Glycerol
15,0 % (v/v)	99,9 % Glycerol		
pH5,8		pH5,8	
<u><i>MS- Medium</i></u>		<u><i>10 x Majorelemente, für MS</i></u>	
20 g	Sacharose	12,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 ml	Minor	188 mM	KNO <sub>3</sub>
100 ml	Mayor	206 mM	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
12,5 ml	Organics	15,0 mM	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
5 ml	FeSO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> -EDTA	29,9 mM	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
pH6			
6,5 g	Agar		
<u><i>Hormonstocks</i></u>		<u><i>80x Organics für MS</i></u>	
5,69 mM	KOH (f.c. 2,0 mg/ml)	2,13 mM	Glycin
1,07 mM	NAA (f.c. 0,20 mg/ml)	325 nM	Nicotinsäure
0,64 mM	GA3 (f.c. 0,22 mg/ml)	236 nM	Pyridoxin (Vit. B6)
11,3 mM	Folsäure (f.c. 5,0mg/ml)	23,7 nM	Thiamin HCl (Vit. B1)
0,82 mM	Biotin (f.c. 0,20 mg/ml)	44,4 mM	myo-inosit
148 mM	Adenin (f.c. 20 mg/ml)		

<u>2 x ER- Medium</u>		<u>100 x Minorelemente</u>	
2 x	10 x Majorelemente	10,0 mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
2 x	100 x Minorelemente	11,2 mM	MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O
2 x	80 x Organics	3,0 mM	ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O
2 x	200 x Na <sub>2</sub> EDTA / FeSO <sub>4</sub>	0,50 mM	KI
11,4 µM	Zeatinribosid(2mg /ml)	103 nM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O
214 nM	NAA (0,20mg/ml)	10,5 nM	COCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O
128 nM	GA3 (0,22mg/ml)	10,0 nM	CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O
2,26 µM	Folsäure (5,0mg/ml)		
0,41 µM	Biotin (0,20mg/ml)		
592 µM	Adenin (20mg/ml)		
161 mM	Glucose.H <sub>2</sub> O		
1,05 mM	Claforan (500/385mg/ml)		
pH5,8			
2 x	Agar		

### 2.1.8.2. Antibiotikastocklösungen

50 mg/ml	Rifampicin (In DMSO gelöst)
40 mg/ml	Gentamycin
80 mg/ml	Spektinomycin
385 mg/ml	Claforan
200 mg/ml	Streptomycin
100 mg/ml	Kanamycin
100 mg/ml	Ampicillin
100 mg/ml	Carbenicillin

### 2.1.8.3. Lösungen für die Präparation und Transfektion von Kartoffelprotoplasten

#### K3 (0,4M)-Medium für transiente Transfektion

1 x	10 x	Makroelemente für K3
1 x	1000 x	Mikroelemente für K3
0,1 mM(1x)	200 x	EDTA/Eisen für K3
1 x	1000 x	Vitamine für K3
73 nM	100 x	Ca-Phosphat fürK3
555 nM		myo-Inositol
1,7 mM		D(+)-Xylose
0,4 M		Saccharose
pH 5,6.		
5,4 pM	1000 x	NAA für K3
0,9 pM	500 x	Kinetin für K3

#### 1000 x Naphthyllessigsäure (NAA) für K3

5,4 nM	NAA
--------	-----

#### 100 x Ca-Phosphat für K3

7,3 mM	CaHPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O
--------	---------------------------------------

#### 1000 x Vitamine für K3

0,8 mM	Nicotinacid
0,49 mM	Pyridoxin•HCl
2,49 mM	Thiamin•HCl

#### W5-Medium

150 mM	1,0 M	NaCl
125 mM	1,0 M	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O
5 mM	1,0 M	KCl

#### 10x Makroelemente für K3

12,5 mM	KH <sub>5</sub> PO <sub>4</sub>
61,2 mM	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O
247 mM	KNO <sub>3</sub>
119 mM	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
10,1 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20,8 mM	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O

#### PEG Lösung

40,0 %(w/v)	PEG6000
0,1 M	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •H <sub>2</sub> O
7,3 %(w/v)	Mannitol

#### 500 x Kinetin für K3

465 pM	Kinetin
--------	---------

#### 200 x EDTA/Eisen

20,0 mM	Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O
20,0 mM	Fe(II)SO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O

#### 1000 x Mikroelemente für K3

4,5 mM	KI
48,5 mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
59,2 mM	MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O
7,0 mM	ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O
1,0 mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O
0,1 mM	CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O
0,1 mM	CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O

#### Ma-Mg Lösung

0,4 M	Mannitol
15,0 mM	MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O
0,1 %	MES

### 2.1.8.4. Lösungen für die Southern blot-Analyse

#### Prehybridisation Solution

6 x 20x      SSC pH7,0;  
 5 x 50x      Denhardt`s Solution;  
 0,5 % [w/v]    SDS (20 % [w/v]);  
 0,1 mg/ml     ST-DNA

#### Denaturation Solution

1,5 M    NaCl  
 0,5 M    NaOH

#### 50 x Denhardt`s Solution

1,0 % [w/v]    Ficoll®400  
 1,0 % [w/v]    Polyvinilpyrrolidone 90M1(1.100.000)  
 1,0 % [w/v]    Albumin bovine serum

#### SDS (20 % w/v)

20 %    SDS

#### 20 x SSC

3,0 M    NaCl  
 0,3 M    tri-Sodium citrate-2-hydrate  
 pH 7,0

#### Depurination Solution (DS)

0,25 N    HCl

#### Neutralisation Solution

1,0 M    Tris (hydroxymethyl)-aminomethan  
 1,5 M    NaCl  
 pH8,0

#### Blocking Solution

5 %    SDS  
 125 mM    NaCl  
 17 mM    Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 8 mM    NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 pH7,2

#### Wash Solution I

0,5 %    SDS  
 12,5 mM    NaCl  
 1,7 mM    Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 0,8 mM    NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 (1:10 Blocking Solution)

#### Wash Solution II (10X)

100 mM    Tris-HCl  
 100 mM    NaCl  
 10 mM    MgCl<sub>2</sub>  
 pH9,5

### 2.1.8.5. Lösungen für die Regeneration von Protoplasten zu Kartoffelpflanzen

<u>SKM</u>		<u>Maiors, für SKM</u>	
100 ml	Maiors (für SKM)	6,8 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 ml	Minors (für SKM)	3 g	KCL
2 ml	Organics (für SKM)	3,5 g	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O
5 ml	EDTA/Eisen (für SKM)	19 g	KNO <sub>3</sub>
		6 g	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O
10 g	Sacharose		
10 g	Glukose		
40 g	Mannitol		
0,25 g	Fructose	0,2 g	ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O
0,25 g	Ribose	2.5 mg	KJ
0,25 g	Xylose	0,3 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0,25 g	Mannose	25 mg	NaMoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O
0,25 g	Rhamnose	2,5 mg	CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O
0,25 g	Callobiose	1 g	MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O
0,25 g	Sorbitol		
0,25 g	Inositol		
40 µl	Folsäure		
25 µl	Biotin	0,66 g	NaEDTA
25 µl	Aminobenzoessäur	0,76 g	FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O
500 µl	Riboflamin		
500 µl	Ascorbinsäure		
500 µl	BAP		
500 µl	NAA		
22 ml	Coconutwater		
0,25 g	Casein (Pepton aus Casein)		
2 g	BSA		
pH5,6			

<u>Organics für SKM</u>		<u>Stammlösungen für SKM</u>	
250 mg	Nicotinsäure	5 mg/ml	Folsäure
25 mg	Pyridoxin HCl	0,2 mg/ml	Biotin
100 mg	Thiamin HCl	0,4 mg/ml	Aminobenzoessäure
25 mg	Ca-Panthotenat	0,2 mg/ml	Riboflavin
25 mg	Choline Chloride	2 mg/ml	Ascorbinsäure
		2 mg/ml	BAP
		0,8 mg/ml	NAA

## 2.2. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Standardtechniken, wie die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten oder die Reinigung und Präzipitation von Nukleinsäuren wurden wie in Sambrook et al., 1989 beschrieben durchgeführt. Restriktionen der DNA mit verschiedenen Enzymen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde der Qiaex II Kit (Qiagen) verwendet.

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch in einem Spektrum von 200 nm bis 350 nm bestimmt.

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde der TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Für die TOPO-Klonierung von PCR-Produkten aus Ansätzen mit thermostabiler Polymerase mit Korrekturfunktion wurden A-Überhänge mit Hilfe Taq-Polymerase eingefügt. Das PCR-Produkt wurde mit dem 1 µl 2,5 mM dNTPs und 1 U Taq-Polymerase gemischt und 15 min bei 72°C im Thermomixer inkubiert.

### 2.2.1. Transformation und Herstellung von transformationskompetenten Bakterien (*E. coli*, *A. tumefaciens*)

Die Transformation von *E. coli* erfolgte mit chemisch kompetenten Zellen der Stämme DH5α oder Top10.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und jeweils 100 µl Zellen mit einem 5 µl Ligationsansatz, oder 1,0 ng Plasmid-DNA vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem 30 s Hitzeschock bei 42°C, wurde die Mischung sofort wieder auf Eis gegeben. Zunächst wurde zu dem Ansatz 150 µl SOC Medium zugegeben und die Zellen zur phänotypischen Expression der Antibiotikaresistenz 30 min bei 37°C 14000 Upm auf einem Thermomixer inkubiert.

Anschließend wurde die Zellen auf selektiven LB-Platten ausplattiert und Ü.N. bei 37°C inkubiert.

Herstellung der chemisch kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte nach Sambrook und Russell (2001).

20 ml LB-Medium wurde, mit einer Einzelkolonie eines *E. coli* Stammes Ü.N. bei 37°C (300 Upm) inkubiert. Die 300 ml Hauptkultur am folgenden Tag wurde mit 1/100 Vol. der Vorkultur angeimpft. Es wurde jeweils noch 3 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung und 3 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung zugegeben. Bakterienkultur wurde bei 37°C (300 Upm) bis OD<sub>600</sub> 0,6-0,7 weiter kultiviert (etwa 2,5 h).

Die weiteren Schritte wurden in Kühlraum mit vorgekühlten Geräten und Lösungen durchgeführt.

Die Zellsuspension wurden 20 min auf Eis inkubiert und bei 4°C geerntet (8 min und 3000 Upm). Danach wurden die Zellen in 100 ml eiskalter RF1-Lösung vollständig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nochmal 30 min auf Eis inkubiert und danach erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml RF2-Lösung gelöst und 15 min auf Eis inkubiert.

Die Zellsuspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Transformationseffizienz dieser Zellen lag in der Regel bei  $1,0 \cdot 10^6$  Transformanden pro µg Plasmid-DNA.

Elektrotransformation von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte mit elektrokompenten Zellen durch Elektroporation.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 ng T-DNA Plasmid gemischt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde in Elektroporationsküvetten überführt und mit einem Gene Pulser® bei 2,5 kv, 25 µF und 200 Ω behandelt. Danach wurde sofort 200 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei 28°C und 14000 Upm auf einem Thermomixer inkubiert.

Anschließend wurde die Mischung auf selektiven LB-Platten ausplattiert und 2 Tage bei 28°C inkubiert.

Die Herstellung elektrokompenten Zellen erfolgte modifiziert nach Nagel et al., 1990.

Zur Herstellung elektrokompenten Zellen wurde 20 ml LB-Medium (+ Rifampicin, Gentamycin, Kanamycin) mit einer Einzelkolonie eines *A. tumefaciens* Stammes bei 28°C und 200 Upm Ü.N. inkubiert. Danach wurde die Vorkultur in eine 400 ml Hauptkultur überführt und weiter kultiviert bis OD<sub>600</sub> 1,6.

Die weiteren Schritte wurden in Kühlraum mit dem vorgekühlte Materialien und Lösungen durchgeführt.

Die Zellsuspension wurde nach dem 30 min Inkubation auf Eis für 15 min bei 4°C und 5000 Upm zentrifugiert. Zunächst wurde das Pellet in 400 ml eiskaltes Wasser (H<sub>2</sub>O) resuspendiert und die Zellen erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmal wiederholt

(1/2 Vol. H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>). Danach wurden die Zellen in eiskaltes 50 ml 10 % Glycerol aufgenommen und 15 min bei 4°C und 5000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3,5 ml 10 % Glycerol resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.2. Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte nach der „boiling“ Methode (Sambrook et al, 1989). 1,5 ml einer *E. coli* –Übernachtskultur wurden 30 s bei R.T. und 1400 Upm geerntet, das Pellet in 400 µl STET-Lysozym resuspendiert. Die Lyse der Zelle erfolgte bei 99°C für 45 s. Anschließend wurden die Zelltrümmer und die denaturierte genomische DNA von der Plasmid DNA durch Zentrifugieren abgetrennt (10 min, 14000 Upm, R.T.). Mit Hilfe eines Zahnstochers wurde das Pellet aus dem Reaktionsgefäß entfernt, die verbleibenden Nukleinsäuren mit 400 µl Isopropanol und 50 µl NaAc (pH 4,9) gemischt und 10 min bei R.T. 14000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE/RNase (100 µg/ml) aufgenommen. Zur vollständigen Lösung des Pellets wurde der Ansatz 15 min bei 50°C und 14000 Upm auf einem Thermomixer inkubiert und anschließend 1 min bei 14000 Upm abzentrifugiert.

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid DNA wurde ein Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

STET Lösung: 10 mM Tris-Cl (pH 8,0); 100 mM NaCl; 1,0 mM EDTA; 5,0 % (v/v) Triton X-100.

### 2.2.3. Agrobakterientransformation von Internodiensegmenten bei Kartoffeln

Stabile Transformation von Internodiensegmenten bei Kartoffel wurde nach modifizierte Methode von Horsch et al. (1985), durchgeführt.

100 ml Medium (2.1.4.) wurde mit frisch transformierten Agrobakterien bei 28°C (200 Upm) inkubiert bis die optische Dichte der Kultur bei OD<sub>600</sub> zwischen 0,6-1,0 lag.

Die Internodien der Kartoffelpflanzen wurden in je 3-5 mm lange Stückchen steril geschnitten und für kurze Zeit in MS Medium gelagert.

Zunächst wurde das überschüssige MS Medium mit Hilfe einer Pumpe steril abgesaugt.

Nach 5 min Inkubation bei R.T. in Agrobakterienkultur wurden die Internodien (ca. 100-120) mit 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> gewaschen.

Anschließend wurden die Internodien 5 mal je 5 min mit 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> gewaschen und dann 1-2 Tage bei 18°C im 16 h Licht 8 h Dunkel Rhythmus auf MS Medium inkubiert.

Danach wurden jeweils 30 Internodien alle 14 Tage auf eine frische ER (Claforan, Kanamycin) Platte umgesetzt zur Sprossregeneration einer transgenen Kartoffelpflanze.

### 2.3. Präparation genomischer DNA aus Kartoffelpflanzen

Die Isolation genomische DNA wurde nach einer modifizierten CTAB-Methode durchgeführt (Saghai-Maroo et al., 1984).

250 mg frisches Blattmaterial wurde in einem Mörser mit 1ml CTAB (2 %) fein gemörsert. Das zermöserte Material wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 h im Wasserbad bei 60°C inkubiert. Die Blattsuspension wurde mit 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) versetzt und gut gemischt.

Nach 15 min Abzentrifugieren bei 6000 Upm (R.T.) wurde der wässrige Überstand in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. In der organischen Phase zurückgebliebenen Zellwandbestandteile und Polysaccharide wurden verworfen.

Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt (2,5 Vol.), durch 10 min Zentrifugation, bei 14000 Upm, R.T. pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen.

Anschließend wurde die gefällte DNA in 10 mM Tris pH 8,0 (100 µg/ml RNaseA) aufgenommen und bis zur vollständigen Lösung bei 50°C im Thermomixer 15 min bei 1400 Upm inkubiert. Zur Überprüfung der DNA-Qualität und Bestimmung der Konzentration der jeweiligen DNA-Präparationen wurden 0,5 µl Aliquots in einer Agarosegelelektrophorese analysiert. λDNA diente als Standard für die Größen- und Konzentrationsabschätzung. Auf diese Weise wurde pro Präparation bis zu 100 µg genomische DNA aus Kartoffeln gewonnen. Diese DNA wurde bei 4°C gelagert.

CTAB-Puffer: 100 mM Tris·HCl pH8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2,0 % CTAB.

#### 2.3.1. Southern blot-Analyse

5 µg genomische DNA von Kartoffelpflanzen wurden in einem 30 µl Ansatz mit geeigneten Restriktionsenzymen behandelt und auf einem 0,8 % Agarose-Gel bei 120 V aufgetrennt. Für einen erleichterten Transfer vor allem großer DNA-Fragmente auf eine Hybond-N+ (Amersham) Membran wurde das Agarose-Gel nach einem Protokoll von Schleicher & Schuell aufbereitet. Unter Verwendung von 20 x SSC Lösung als Transfermedium wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe eines Turboblotter (Schleicher & Schuell) auf die Hybond-N+ (Amersham) oder auf eine Millipore INYU00010 Membran übertragen.

Die Membran wurde danach mit 6 x SSC gewaschen und bei R.T. getrocknet. Die Fixierung der DNA an die Membran wurde durch 15 min Backen bei 80°C und durch Vernetzung mit UV-Strahlung (0,005 J/cm<sup>2</sup>) durchgeführt.

Der spezifische Nachweis von membrangebundener DNA erfolgte durch Hybridisierung mit einer Biotin-markierten Probe (New England BioLabs).

Prehybridisierung der Membran in Prehybridisierungspuffer und ÜN Hybridisierung wurde nach einem Protokoll der Fa. New England BioLabs durchgeführt.

Die Sonden für die Hybridisierung wurden mit Hilfe des „NEBlot Phototope Kit“ (New England BioLabs) hergestellt. Für die Sonde wurde 10 – 500 ng DNA Fragmente genommen. Die hybridisierte Membrane wurde nach Angaben des Herstellers aufbereitet und in einem ChemiImager (AlphaInnotec) mit einem „Phototope- Star Detection Kit“ (New England BioLabs) detektiert.

### **2.3.2. PCR**

Standard-PCR-Ansätze enthielten 10 ng Template, je 5 µM Primer, 25 mM dNTPs und 1 U Taq-Polymerase (Laborpräparat) in 10 x PCR-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,3; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl). Die Amplifikation erfolgte in der Regel in 30 Zyklen (1 min 94°C; 1 min 50°C – 60°C; 1,5 min 72°C).

Die PCR-Ansätze für die Gensynthese bestanden aus je 100 µM Primer, 10 mM dNTPs und 1,0 U Taq-Polymerase (Laborpräparat) in 10 x PCR-Puffer.

DNA-Fragmente wurden per Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung überprüft. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 x TBE Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) verwendet.

5 x TBE Puffer: 440 mM TrisBase; 440 mM Borsäure; 10 mM 0,5 M EDTA pH 8,0.

### **2.3.3. Sequenzierung**

DNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe spezifischer Primer bei der Fa. MWG. Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden mit der Software Vektor NTI 8,0 verarbeitet.

### 2.3.4. Sonden für die Southern blot-Analyse

<i>nptII</i>	ein 981 bp <i>XbaI/SphI</i> Fragment, aus pLH9000;
PWx	ein 962 bp <i>XbaI/BglIII</i> Fragment, aus pGRKR5#1 (diese Arbeit);
<i>asGBSS</i>	ein 994 bp <i>MluI/BglIII</i> Fragment, aus pGRKR6#39 (diese Arbeit); ein 1963 bp <i>BglIII/MluI</i> Fragment, aus pRKR4#10 (diese Arbeit); ein 1928 bp <i>XbaI/BglIII</i> Fragment, aus pRKR1#4 (diese Arbeit); ein 1528 bp <i>HinDIII</i> Fragment, aus pMFlp9-1.

## 2.4. Präparation und Transformation von Kartoffelprotoplasten

### 2.4.1. Präparation von Kartoffelprotoplasten

Die Präparation von Kartoffelprotoplasten (modifiziert nach Draper et al., 1988) erfolgte von 4 Wochen alten *in vitro*-Kartoffelpflanzen.

*In vitro*-Kartoffelpflanzen wurden vor der Präparation 1 Woche dunkel gestellt.

Dann wurde ca. 3,0 g Blattmaterial in etwa 4 mm<sup>2</sup> große Segmente geschnitten, in 30 ml Enzymlösung aus Cellulase und Mazerozym überführt und nach 30 s Vakuumfiltration Ü.N. bei 28°C 40 rpm im Dunkel inkubiert.

Die Protoplastensuspension wurde durch Gaze filtriert, um grobe unlösliche Bestandteile abzutrennen.

Anschließend wurde die Protoplastensuspension bei 1000 Upm und 21°C für 10 min zentrifugiert. Intakte Protoplasten bilden am Meniskus eine grüne Schicht. Pelletierte Zellreste wurden entfernt. Die Protoplasten wurden in W5 aufgenommen und durch 10 min Zentrifugation bei 600 Upm 21°C pelletiert.

Die gereinigte Protoplasten wurden in 10 ml W5 aufgenommen und 2-2,5 h bei 4°C zur Regeneration der Membranen inkubiert. Die Zelldichte wurde im Lichtmikroskop in einer Zählkammer bestimmt.

### 2.4.2. Transformation von Kartoffelprotoplasten modifiziert nach Bilanz et al., 1994

Nach einer Regenerationsphase wurde die Protoplastensuspension bei 600 Upm und 21°C für 10 min zentrifugiert. Letztendlich wurden 10<sup>6</sup> Protoplasten in 300 µl Ma-Mg Lösung aufgenommen.

Die Protoplasten wurden mit dem 60 µg DNA vorsichtig gemischt und 5 min bei R.T. inkubiert. Danach wurde 300 µl PEG-Lösung zugegeben und der Ansatz für weitere 13 min bei R.T. inkubiert. Die Protoplasten wurden mit W5 gewaschen, anschließend in K3 Medium (+ 231 mg/ml Claforan) aufgenommen und 2 Tage im Dunkeln bei 21°C inkubiert.

### **2.4.3. Histochemische GUS-Färbung**

Protoplasten wurden mit Hilfe einer Pumpe auf NC-Filter (Schleicher & Schuell, Durchmesser 4 cm) überführt und anschließen bei R.T. getrocknet.

Vernetzung von Protoplasten mit der Oberfläche der Filter erfolgte durch Inkubation in formaldehydhaltiger Fixierlösung. Danach wurden die Filter zweimal mit Phospat-Puffer (pH 7,0) gewaschen und bei R.T. getrocknet. Anschließend wurden die Filter auf die Substratlösung gelegt und Ü.N. bei 37°C inkubiert.

Die Filter wurden getrocknet und blau gefärbte Protoplasten in Lichtmikroskop ausgezählt.

Fixierlösung: 0,3 M Mannitol; 10 mM MES; (+ 81 µl (37 %) Formaldehyd pro 10 ml Lösung)

Phosphatpuffer: 50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH7,0

Substratlösung: 2 mM X-Gluc, (in 50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH7,0).

### **2.5. Regeneration von Protoplasten zu Kartoffelpflanzen**

Die Regeneration von Protoplasten zu Kartoffelpflanzen erfolgte nach einer modifizierte Methode von Schilde-Rentschler et al.1988.

Nach der transienten Transformation wurde die Protoplastensuspension mit W5 versetzt und bei 1000 Upm und 21°C für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 0,5 ml K3 Medium und 0,5 ml SKM Medium vorsichtig resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 1,0 ml Alginatlösung und eine vorsichtige Mischung der Flüssigkeiten. Anschließend wurde die Alginatkultur tropfenweise in eiskalte 50 mM CaCl<sub>2</sub> Lösung gegeben.

Nach 2 h wurde die 50 mM CaCl<sub>2</sub> Lösung durch eine 10 mM CaCl<sub>2</sub> Lösung ersetzt und zunächst 2 Tage bei 4°C aufbewahrt. Danach wurde die CaCl<sub>2</sub> Lösung gegen SKM ausgetauscht und in einem Brutschrank bei 22°C in Dunkel kultiviert bis sich Mikrokalli ausbildeten.

Sobald die Mikrokalli sich entwickelten, wurde SKM durch Na-Citrat ersetzt und 2-4 h bei R.T. geschüttelt. Dabei löst sich das Alginat auf. Die befreiten Mikrokalli wurden auf ER-

Medium überführt, mit SKM bedeckt und bei 18°C in einem 16 h Licht 8 h Dunkel-Rhythmus kultiviert.

Regenerierte Sprossspitzen wurden den Ansätzen entnommen und auf MS-Medium weiter kultiviert.

## **2.6. *In vitro*-Kultur von Kartoffelpflanzen**

Für die Sterilkultur von Kartoffelpflanzen wurden die Sprossspitzen oder Seitenmeristeme mit 1-2 Blätter unter sterilen Bedingungen von der Pflanze abgeschnitten und auf MS-Medium in Weckgläsern gesetzt. In einer Klimakammer bei 18°C mit einem 16 h Licht 8 h Dunkel-Rhythmus wurden die Pflanzen für 4 Wochen weiter kultiviert. Aus den Kartoffelblättern wurden genomische DNA oder Kartoffelprotoplasten isoliert.

Die Internodien von *in vitro*-Kartoffelpflanzen wurden für die Transformation mit Agrobakterien verwendet.

## **2.7. *In vitro*-Knollenbildung**

Für die *in vitro*-Knollenbildung wurden sterile Sprosskulturen von Kartoffelpflanzen auf Knolleninduktionsmedium gelegt und bei R.T. im Dunkeln gelagert.

Nach etwa 3 Wochen bildeten sich aus den Meristemen Mikroknollen.

Knolleninduktionsmedium, für 1 Liter: 50 ml Maiors; 5 ml Minor; 2,5 ml EDTA/Eisen Stammlösung; 12,5 ml Organics; 80 g Sacharose; 5 mg Ancymidol; 5 mg Kinetin; pH 5,7; 7,5 g Agar.

## **2.8. Anlegen einer Dauerkultur**

Zur längerfristigen Lagerung von Pflanzenmaterial dienen Langzeitkulturen, wobei Sprossspitzen auf Langzeit-Medium bei 18°C im einem 16 h Licht 8 h Dunkel-Rhythmus kultiviert werden. Nach 2-4 Wochen wurden sie bei 6-10°C weiterkultiviert. Die Langzeitkulturen waren ein Jahr haltbar.

Langzeit-Medium: MS-Medium; 4 % Sorbit, pH6,0.

## 2.9. Kartoffel-Stärketest mit Lugol's Lösung

Für einen qualitativen Stärketest wurden Mikrokartoffelknollen (*in vitro*) aufgeschnitten, und die stärkehaltige Zellflüssigkeit mit 20 µl Lugol's Lösung gefärbt.

Die Färbung der Stärkekörner wurde unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

Eine blaue Färbung deutet auf die native Form der Stärke mit Amyloseanteil, rote Färbung der

Stärkekörner weist auf eine starke Reduzierung des Amyloseanteils in den Stärkekörner hin und zeigt die Aktivität der eingeführten *asGBSS*-Sequenzen bei der postranskriptionalen Hemmung der granulär gebundenen Stärkesynthase *GBSS*.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Gensynthese des $\gamma\delta$ Resolvase/res Systems

##### 3.1.1. Entwurf einer $\gamma\delta$ Resolvase mit optimierter Basenpaarabfolge zur Anpassung der Kodonnutzung für Kartoffeln

In einer allgemein zugänglichen Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) wurden die entsprechenden DNA-Sequenzinformationen der  $\gamma\delta$  Resolvase in einem Eintrag des F-Plasmids mit der Genbanknummer AP001918 (Broom et al., 1995) gefunden. Die *res*-Sequenzabfolge wurde aus der bekannten Literatur (Falvey & Grindley, 1987) entnommen.

Der offene Leserahmen der  $\gamma\delta$  Resolvase wurde für eine Expression in Kartoffel in Anlehnung an die Kodonnutzung in *S. tuberosum* ([www.Kazusa.or.jp/codon](http://www.Kazusa.or.jp/codon)) optimiert. Außerdem war ein kassettenartiger Aufbau des synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase Gens vorgesehen. Die Einführung der Schnittstellen *HinDIII*, *MfeI*, *BamHI*, *ScaI* und *BglII* und optimierter Kodons des synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase Gens berücksichtigten die natürliche Aminosäureabfolge des  $\gamma\delta$  Resolvasegenprodukts. Der notwendige Einbau einer *NcoI* Schnittstelle am 5' Ende führt dazu, dass ein zusätzliches GGA Kodon eingeführt wurde (Abb. 3).

Bis auf die am 5' Ende eingeführte Basen und Mutationen an den Kodon-Positionen E102, E124 und M103 sind die abgeleiteten Proteinsequenzen der synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase Varianten dieser Arbeit identisch mit der Aminosäureabfolge der  $\gamma\delta$  Resolvase mit der Genbanknummer AP001918.

	<i>Nco</i> I (1)	1	50
Resolvase	(1)	--ATG--CGACTTTTTGGTTACGCACGGGTATCAACCAGCCAGCAATCT	
synthetisch	(1)	<u>CCATGG</u> GAA GACTTTTTGGATATGCTAGAGTTCTACTTCTCAACAATCT	
		51	100
Resolvase	(46)	CTCGATATTCAGGTTTCGGCACTCAAAGACGCAGGCGTAAAGCAAATCG	
synthetisch	(51)	CTTGATATTCAGTTAGAGCACTAAGGATGCTGGAGTTAAGGCTAATAG	
		101	150
		<i>Hin</i> D III (116)	
Resolvase	(96)	CATCTTTACTGACAAAGGCATCGGCAGTTC AAGCGATCGGAAAGGGCTGG	
synthetisch	(101)	AATTTTACTGATAAAGCTTCTGGATCTTCTTCTGATAGAAAGGGACTTG	
		151	200
Resolvase	(146)	ACTTGTCTGAGGATGAAGGTGGAGGAAGGTGACGTCATCTTGGTGAAGAAA	
synthetisch	(151)	ATCTTCTTAGAATGAAGGTGAAGAAGGAGATGTTATCTTGTTAAGAAAG	
		201	250
		<i>Mfe</i> I (238)	
Resolvase	(196)	CTTGACCGCCTTGGGCGCGATACTGCTGACATGATCCAGTTAATAAAAGA	
synthetisch	(201)	TTGGATAGACTTGGAAAGATACTGCTGATATGATTC AATTGATTAAGGA	
		251	300
Resolvase	(246)	GTTTGAAGCCCAAGGTGTATCCATTGTTTATTGATGACGGAATCAGTA	
synthetisch	(251)	ATTTGATGCTCAAGGAGTTCTATTAGATTTATTGATGATGGAATTTCTA	
		301	350
Resolvase	(296)	CCGATGGGGAGATGGGTAAAATGGTTGCTACTATTCTATCTGCAGTGGCC	
synthetisch	(301)	CTGATGGATACATGGCAAAAGATGGTTGTTACTATTCTTCTGCTGTTGCT	
		351	400
		<i>Bam</i> H I (368)	
Resolvase	(346)	CAGGCAGAACGACAGAGAATACTAGAGCGTACCAATGAAGGTGCGCAAGA	
synthetisch	(351)	CAAGCTGAAAGACAAAGATCCCTCAAGAGAACTAATGAAGGAAGACAAGA	
		401	450
Resolvase	(396)	GGCAATGGCAAAAGGAGTTGTTTTGGTAGAAAAGAAAATAGATAGAG	
synthetisch	(401)	AGCTATGGCTAAGGGAGTTGTTTTGGAAAGAAAAGAAAAGATTGATAGAG	
		451	500
		<i>Sca</i> I (458)	
Resolvase	(446)	ATGCAGTATTAAATATGTGGCAACAGGGTTAGGTGCCTCACATATATCA	
synthetisch	(451)	ATGCAGTACTTAAATATGTGGCAACAAGGACTTGGAGCTTCTCATATTTCT	
		501	550
Resolvase	(496)	AAAACAATGAATATTGCTCGTTCAACAGTATATAAAGTAATAAATGAAAG	
synthetisch	(501)	AAGACTATGAACATTGCTAGATCAACTGTTTATAAGGTTATTAAATGAATC	
		551	562
		<i>Bgl</i> II (558)	
Resolvase	(546)	CAACTAA-----	
synthetisch	(551)	TAAATAAAGATCT	

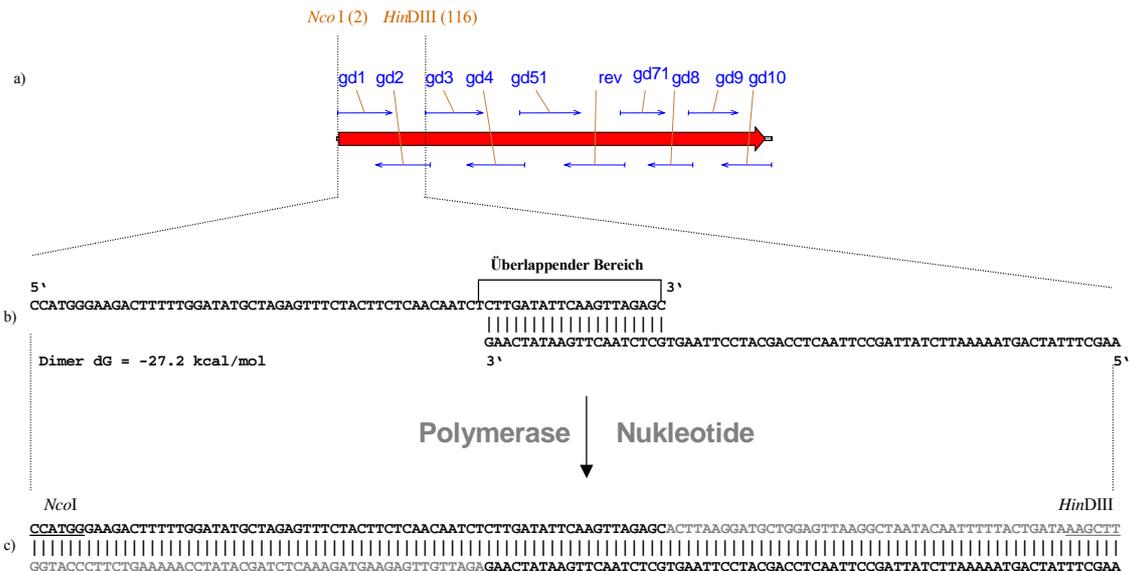
**Abb. 3 : Vergleich zwischen synthetischer  $\gamma\delta$  Resolvase und der  $\gamma\delta$  Resolvase mit ursprünglicher Basenpaarabfolge.**

Änderungen durch gerichtete Mutationen sind mit schwarzen Buchstaben hervorgehoben. Die ursprüngliche kodierende Sequenz der  $\gamma\delta$  Resolvase ist 552 bp lang. Die synthetische  $\gamma\delta$  Resolvase trägt innerhalb des offenen Leserahmens 4 Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Hin*DIII, *Bam*HI, *Mfe*I, *Sca*I. Das 5' und das 3' Ende des synthetischen Gens ist von einer *Nco*I bzw. *Bgl*II Erkennungsstelle umgeben, was zu einer Gesamtlänge von 562 bp führt. Start und Stopkodons sind unterstrichen. Zahlen in Klammer geben die relative Position in bp an. Am 5'-Ende wurde das Arginin – Kodon (CGA→AGA) erhalten. Durch den Einbau einer *Nco*I Schnittstelle wurde ein zusätzliches GGA Kodon (Glycin) eingeführt.

### 3.1.2. Herstellung der Fragmente des $\gamma\delta$ Resolvase Gens

Das  $\gamma\delta$  Resolvase Gen wurde zur Synthese in 5 Fragmente unterteilt, die von singulären Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme umgeben waren (Abb. 3). Für jedes Fragment wurden teilweise überlappende Primer ausgewählt. Die Fragmente wurden aus PCR-gestützten gensynthetischen Ansätzen erzeugt (2.1.6.1.).

Im Folgenden wird im Detail erklärt, wie der Bereich 1-114 bp der  $\gamma\delta$  Resolvase mit Hilfe der Oligonukleotide gd1 und gd2 synthetisiert wurde. Diese Primer wurden in PCR Ansätzen durch Hitze denaturiert und mögliche Sekundärstrukturen entfernt. Bei langsamer Abkühlung hybridisieren diese einzelsträngigen DNA Moleküle über ihre komplementären 3' Bereiche auf 20 bp Länge (Abb. 4). Sie erfüllen neben der Funktion als Startermoleküle im PCR-Ansatz zugleich die Funktion einer Matrize. Die einzelsträngigen Bereiche wurden mit Hilfe der Taq-Polymerase in 30 Zyklen (2.3.2.) aufgefüllt.



### 114 bp $\gamma\delta$ Resolvase-Fragment gd12

**Abb. 4 : Übersicht der Synthese der  $\gamma\delta$  Resolvase am Beispiel des 5' Bereiches (114 bp  $\gamma\delta$  Resolvase -Fragment gd12).**

- Der rote Pfeil symbolisiert synthetische  $\gamma\delta$  Resolvase Sequenzen des offenen Leserahmens; durch blaue Pfeile ist die Anordnung der verwendeten Primer dargestellt. Das gd12 Fragment ist von *NcoI* und *HindIII* umgeben. Zahlen in Klammern geben die Positionen der Restriktion des 5' → 3' Stranges an.
- Die Oligonukleotide gd1 und gd2 hybridisieren über ihre 20 bp langen überlappenden 3' Bereiche. Die Anlagerung ist energetisch vorteilhaft ( $\Delta G = -27,2$  kcal/mol).
- Das amplifizierte 114 bp  $\gamma\delta$  Resolvase-Fragment gd12 aus einem gensynthetischen Ansatz. Basen der Startermoleküle sind schwarz dargestellt, Polymerisationsprodukte grau. Die Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (*NcoI* und *HindIII*) sind unterstrichen.

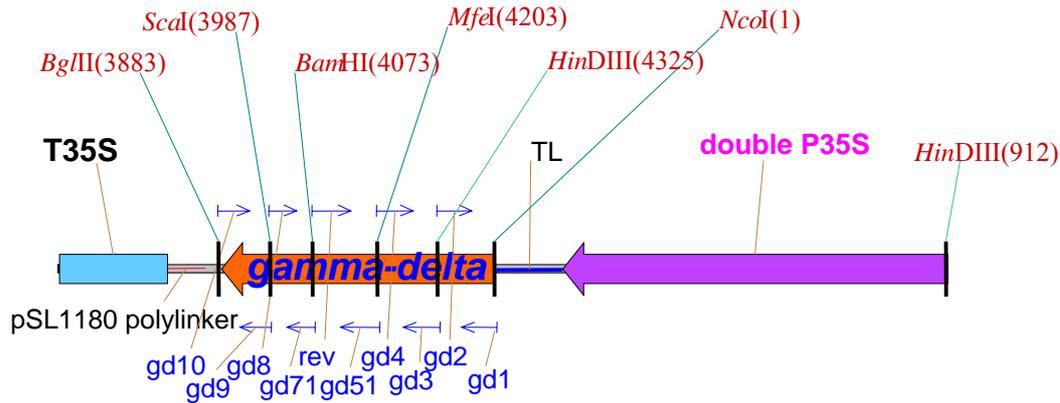
Mit vergleichbaren gensynthetischen Ansätzen wurden weitere Fragmente des synthetischen Leserahmens der  $\gamma\delta$  Resolvase erzeugt (2.1.6.1.). Mit den Primern gd3 und gd4 wurde ein 122 bp langes Fragment erzeugt, dessen 5' Bereich und 3' Bereich von *HindIII* bzw. *MfeI* Erkennungssequenzen umgeben ist. Die Primerkombination gd51 und rev führte zu einem 130 bp langen Fragment, das am 5' Bereich und 3' Bereich *MfeI* bzw. *BamHI* Erkennungssequenzen trägt. Ein 86 bp langes Fragment ergab die Primerkombination gd71 und gd8. Dieses Fragment ist im 5' und 3' Bereichs von *BamHI* bzw. *ScaI* Erkennungssequenzen begrenzt. Mit den Primern gd9 und gd10 wurde ein 126 bp langes

Fragment erzeugt. Hier liegen im 5' Bereich und 3' Bereich *ScaI* bzw. *BglII* Erkennungssequenzen.

Abschließend wurden die amplifizierten Fragmente in den pCR4-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert und die entsprechenden Sequenzen überprüft. Die untersuchten Fragmente zeigten keine Abweichungen von der geplanten Ursprungssequenz. Die Plasmide mit den jeweiligen Fragmenten des  $\gamma\delta$  Resolvase Gens wurden mit pTopo-gd12-2#1, pTopo-gd34-2#1, pTopo-gd51rev-2#21, pTopo-gd718-1#22 und pTopo-gd910-2#19 bezeichnet.

### 3.1.3. Herstellung von Genkonstrukten zur Expression der $\gamma\delta$ Resolvase in Kartoffel

Die fünf bereits beschriebenen Restriktionsfragmente des synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase Gens wurden aus den entsprechenden pCR4-TOPO Subklonen isoliert. In einer Ligationreaktion des 3264 bp *PstI/BamHI* Fragments aus pSL1180 (2.1.6.3.) mit dem 86 bp *BamHI/ScaI*-Fragment aus pTopo-gd718-1#22 und dem 126 bp *ScaI/PstI*-Fragment aus pTopo-gd910-2#19 wurde das 3' Ende des  $\gamma\delta$  Resolvase Gens (p1761; 2.1.6.3.) zusammengefügt. In einer weiteren Ligation des 3267 bp *BamHI/NotI*-Fragments aus pSL1180 mit dem 133 bp *NotI/HinDIII*-Fragment aus pTopo-gd12-2#1, mit dem 122 bp *HinDIII/MfeI*-Fragment aus pTopo-gd34-2#1 und mit dem 130 bp *MfeI/BamHI*-Fragment aus pTopo-gd51rev-2#21 wurde das 5' Ende des  $\gamma\delta$  Resolvase Gens (2.1.6.3.) erzeugt. Dieses Genkonstrukt wurde mit p2345-1#8 bezeichnet. Anschließend wurde ein 3775 bp *NcoI/XbaI*-Vektorfragment aus pCre#15 (2.1.5.), mit 35S Promotor- und Terminatorsequenzen des CaMV, ein 77 bp *XbaI/PstI*-Fragment aus pSL1180 als Verbindungsglied, ein 212 bp *PstI/BamHI*-Fragment aus p1761#9 und ein 366 bp *BamHI/NcoI*-Fragment aus p2345-1#8 in einer Ligationreaktion verbunden. Auf diese Weise wurde das Expressionsplasmid  $p\gamma\delta$  der  $\gamma\delta$  Resolvase fertiggestellt (2.1.6.4.). In Abb. 5 ist der relevante Ausschnitt von  $p\gamma\delta$  dargestellt. Das synthetische  $\gamma\delta$  Resolvase Gen liegt zwischen 35S Promotor und Terminator. Zwischen dem 35S Terminator und dem synthetischem  $\gamma\delta$  Resolvase Gen wurde ein Polylinker aus pSL1180 eingeführt. Zwischen dem 35S Promotor und dem synthetischem  $\gamma\delta$  Resolvase Gen befindet sich die „Translationale Leader“ Sequenz (TL), die eine optimale Translation der mRNA vermitteln soll. Das Vektorgrundgerüst stammte aus einem Cre-Expressionsvektor aus der Kollektion unserer Arbeitsgruppe (M. Reichmann, pers. Mitteilung) und enthält weitere Standardelemente zur Klonierung in *E. coli* (nicht gezeigt).



**Abb. 5 : Maßstabgerechte Darstellung des relevanten, 1792 bp langen Fragmentes des  $\gamma\delta$  Resolvase Expressionskonstrukts (Gesamtlänge 4438 bp)  $\rho\gamma\delta$ .**

Das synthetische  $\gamma\delta$  Resolvase Gen (orange) liegt zwischen einem 35S Promotor in zweifacher Anordnung (double P35S, lila) und einem 35S Terminator (T35S, hellblau) aus CaMV. Die Anordnung der verwendeten Primer ist schematisch durch die blauen Pfeile symbolisiert. Die Schnittstellen (*NcoI*, *HinDIII*, *MfeI*, *BamHI*, *ScaI*, *BgIII*) sind durch senkrechte Balken dargestellt. Die relativen Positionen der Schnittstellen sind in Klammern angegeben. Zwischen dem 35S Terminator und dem synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase Gen befinden sich Polylinker Sequenzen aus dem Plasmid pSL1180, zwischen dem 35S Terminator und dem synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase Gen die „Translationale Leader“ (TL) Sequenz aus pCre#15.

### 3.1.4. Gezielte Mutagenese der $\gamma\delta$ Resolvase

Das synthetische  $\gamma\delta$  Resolvase Gen ist durch einen kassettenartigen Aufbau gekennzeichnet und ermöglicht einen gezielten Austausch von  $\gamma\delta$  DNA-Bereichen. Zur Analyse von  $\gamma\delta$  Resolvase Varianten wurden im  $\gamma\delta$  Resolvase Gen gezielt Basenpaarmodifikation eingeführt. Es wurden Primer mit entsprechenden Änderungen in der DNA-Sequenzabfolge verwendet und in wie bereits in Kapitel 3.1.2. beschrieben, gensynthetischen Ansätzen die entsprechenden Fragmente gd56, gd5262, gd78 und gd728 erzeugt (2.1.6.2.). Das Fragment gd56 enthält die Mutation E102Y, gd5262 trägt die Mutation M103I, gd78 besitzt die Mutation E124K und gd728 enthält die Mutation E124Q. Anschließend wurden acht verschiedene Expressionsplasmide der untersuchten  $\gamma\delta$  Resolvase Varianten hergestellt. Eine Zusammenfassung der  $\gamma\delta$  Resolvase Expressionsplasmide ist in Tabelle 2 gezeigt.

**Tab. 2: Varianten der  $\gamma\delta$  Resolvase.**

Expressionsplasmid	Eingeführte Mutation(en)
1. p $\gamma\delta$ E102Y	E102Y
2. p $\gamma\delta$ E124Q	E124Q
3. p $\gamma\delta$ E124K	E124K
4. p $\gamma\delta$ M103I	M103I
5. p $\gamma\delta$ E102YE124Q	E102Y und E124Q
6. p $\gamma\delta$ E102YE124K	E102Y und E124K
7. p $\gamma\delta$ M103IE124Q	M103I und E124Q
8. p $\gamma\delta$ M103IE124K	M103I und E124K

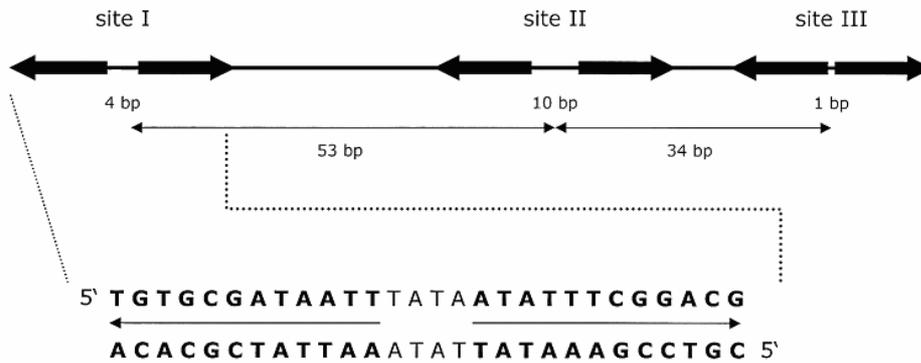
p $\gamma\delta$ E102Y enthält die Mutation an Position E102, an Stelle eines E-Kodons (Glutaminsäure) wurde ein Y-Kodon (Tyrosin) eingesetzt; p $\gamma\delta$ E124Q trägt die Mutation an Position E124, an Stelle eines E-Kodons wurde ein Q-Kodon (Glutamin) eingesetzt; p $\gamma\delta$ E124K hat an Position E124 ein K-Kodon (Lysin); p $\gamma\delta$ M103I trägt an Position M103 ein I-Kodon (Isoleucin); p $\gamma\delta$ E102YE124Q enthält die Mutationen an Positionen E102. Das Q-Kodon an Position 102 wurde durch ein Y-Kodon und E124 durch Q124 ersetzt; p $\gamma\delta$ E102YE124K basiert auf p $\gamma\delta$ E102YE124Q und enthält an Stelle Q124 ein K-Kodon; p $\gamma\delta$ M103IE124Q basiert auf p $\gamma\delta$ E102YE124Q mit dem Unterschied, dass statt E102Y eine M103I Mutation eingeführt wurde; p $\gamma\delta$ M103IE124K basiert auf p $\gamma\delta$ M103IE124Q. Q124 wurde durch K124 ersetzt.

### 3.1.5. Herstellung von *res*-flankierten DNA-Sequenzen

*res*-Sequenzen wurden in Gensynthesen mit Oligonukleotiden, die der Referenzsequenz aus Falvey & Grindley, 1987 entsprechen, erzeugt (2.1.6.5.). Die teilweise überlappenden Primer wurden mit Hilfe der Taq-Polymerase zu doppelsträngiger DNA aufgefüllt.

Es wurden zwei *res*-Sequenzen erzeugt, die jeweils 114 bp bzw. 28 bp lang sind (2.1.6.5.). Die 114 bp lange *res*-Sequenz wurde in gensynthetischen Ansätzen mit den Primern res1 und res2 hergestellt. Die 114 bp *res*-Sequenz besitzt 6 Bindungsstellen für die  $\gamma\delta$  Resolvase, die als Site I, Site II und Site III bezeichnet werden (Abb. 6). Das amplifizierte Fragment wurde in den pCR4-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert und als pTopo-res12-1#1 bezeichnet (2.1.6.5.).

Für die Erzeugung einer 28 bp lange *res*-Sequenz wurde aus gensynthetischen Ansätzen mit den Primern res3 und res4 ein 100 bp langes Fragment mit *res* Site I amplifiziert (Abb. 6) und in den pCR4-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert. Die 28 bp lange *res*-Sequenz ist von Polylinker Sequenzen umgeben und enthält eine Bindungsstelle (Site I) für die  $\gamma\delta$  Resolvase. Diese Plasmid wurde als pTopo-res34-2#17 bezeichnet (2.1.6.5.). Die Basenpaarabfolge der *res*-Abschnitte wurde in Sequenzierungsansätzen überprüft.



**Abb. 6 : Der Aufbau von *res*-Sequenzen.**

Die 114 bp *res*-Sequenz besitzt drei Erkennungssequenzen (Site I, Site II und Site III) für die  $\gamma\delta$  Resolvase. Polindromische Sequenzen sind in der Abbildung durch schwarze Pfeile symbolisiert.

Zwischen den Palindromen befindet sich jeweils eine Lücke von 4 (Site I) bzw. 10 (Site II) oder 1 bp (Site III).

Die Site I entspricht der 28 bp *res*-Sequenz.

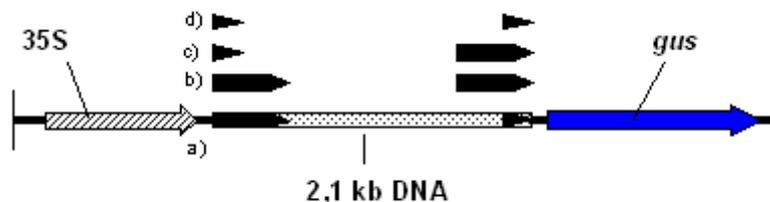
### 3.1.6. Herstellung von *gus*-Reporterengenkonstrukten mit *res*- Zielsequenzen

Es wurden *res*-Substrate mit *gus*-Sequenzen erzeugt. Bei erfolgter sequenzspezifischer Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase sollte ein *gus*-Reporter gen aktiviert werden.

Die Zielplasmide tragen zwei *res*-Sequenzen in identischer Orientierung. Diese *res*-Sequenzen sind zwischen einem CaMV 35S Promotor und einem *gus*-Reporter gen lokalisiert. Zwischen den beiden *res*-Sequenzen wurde eine 2,1 kb lange DNA-Sequenz eingeführt, um sicherzustellen, dass der 35S Promotor nicht in der Lage ist, das *gus*-Reporter gen zu aktivieren.

Es wurden vier verschiedene Zielplasmide erzeugt (Abb. 7), die sich in Länge und Anordnung der eingesetzten *res*-Sequenzen unterscheiden (2.1.6.6.).

pRxr1gus trägt am 3' Bereich des 35S Promotors eine 114 bp lange *res*-Sequenz und am 5' Bereich des *gus*-Reporter gens eine 28 bp lange *res*-Sequenz. pRxr3gus entspricht dem pRxr1gus, mit dem Unterschied, dass an Stelle der 28 bp langen *res*-Sequenz am 5' Bereich des *gus*-Reporter gens eine 114 bp lange *res*-Sequenz eingeführt wurde. prxR2gus1 enthält am 3' Bereich des 35S Promotors eine 28 bp lange *res*-Sequenz und am 5' Bereich des *gus*-Reporter gens eine 114 bp langen *res*-Sequenz. prxR4gus Plasmid entspricht prxR2gus1, nur dass an Stelle der 114 bp langen *res*-Sequenz am 5' Bereich des *gus*-Reporter gens eine 28 bp lange *res*-Sequenz eingeführt wurde.



**Abb. 7 : Schematische Darstellung der *res*-Substrate.**

a) pRxr1gus; b) pRxr3gus; c) prxR2gus und d) prxr4gus.

*res*-Sequenzen (schwarze Pfeile) liegen zwischen 35S Promotor (gestreifter weißer Pfeil) und *gus*-Reportergen (blaue Pfeil). Zwischen den beiden *res*-Sequenzen befindet sich eine 2,1 kb DNA-Sequenz (gepunkteter weißer Balken).

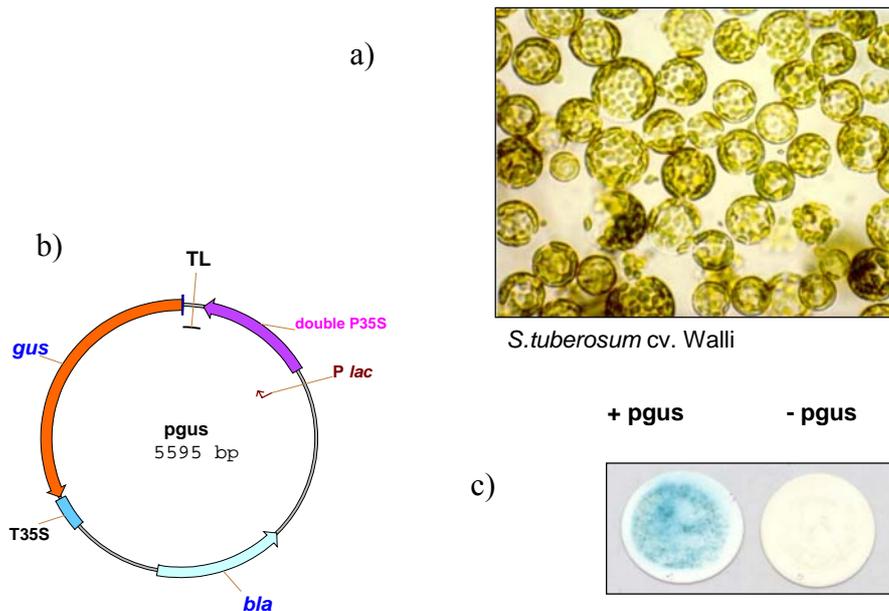
114 bp *res*-Sequenzen (großer schwarzer Pfeil) und 28 bp *res*-Sequenzen (kleiner schwarzer Pfeil) umgeben die zu entfernenden DNA-Abschnitte. Bei erfolgreicher Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase kann der 35S Promotor das *gus*-Gen aktivieren.

### 3.2. Das transiente Testsystem in Kartoffelprotoplasten

Um zu überprüfen, ob das  $\gamma\delta$  Resolvase/*res* System zur gezielten Entfernung von Markergen-Sequenzen in Kartoffel geeignet ist, wurde ein transientes Testsystem entwickelt. Es beruht auf einer vorübergehenden Einführung eines Expressionsplasmids (Transformation) der  $\gamma\delta$  Resolvase (z.B.  $p\gamma\delta$ ) und eines *gus*-Reportergenkonstrukts (z.B. pRxr1gus). Bei Rekombination werden die von *res*-Sequenzen umgebenen Bereiche entfernt. Die Aktivierung des *gus*-Reportergens ist die Folge und zeigt indirekt eine erfolgreiche Rekombinationsreaktion an. Diese Untersuchungen wurden in Kartoffeleinzelzellen, d. h. in Protoplasten aus Blattgewebe durchgeführt.

Es wurden aus 4 - 6 Wochen alten Pflanzen durch enzymatische Behandlung von Blattgewebe Protoplasten isoliert und gereinigt (2.4.1.; Abb. 8a). Für eine Transformationsreaktion wurden  $1 \cdot 10^6$  Protoplasten benötigt. Zur Überprüfung der Transformationseignung der jeweiligen Protoplastenpräparationen wurden Zellsuspensionen mit einem *gus*-Expressionsplasmid (pgus) behandelt (Abb.8b). Ein *gus*-Reportergen steht hier unter der Kontrolle eines konstitutiven, doppelten 35S Promotors. In einer zweiten Kontrollreaktion wurde auf die Protoplasten eine entsprechende Menge Puffer (10 mM Tris pH8,0) gegeben und wie in Kapitel 2.4.2. beschrieben, mit Polyethylenglycol (PEG) Lösung versetzt und 2 Tage im Dunkeln regeneriert. Danach wurden die transienten Transformationsansätze auf Filter übertragen, mit Formaldehyd fixiert und mit dem farblosen Substrat X-Gluc behandelt (2.4.3.).

Bei erfolgreicher Übertragung von pgus wird das *gus*-Gen exprimiert. Der Nachweis dafür sind blau gefärbten Protoplasten- mit Gus Aktivität (Abb. 8c links). In Kontrollreaktionen ohne pgus konnte keine spontane Gus Aktivität beobachtet werden (Abb. 8c rechts).



**Abb. 8 : Das transiente Testsystem in Protoplasten.**

- a) Aus Kartoffelblättern (*S. tuberosum* cv. Walli) isolierte Protoplasten.  
 b) Das 5595 bp große Plasmid *pgus*; das *gus*-Reportergen (*gus*, orange) liegt zwischen einem doppelten 35S Promotor (double p35S, lila) und dem 35S Terminator (T35S, hellblau). Zwischen dem 35S Promotor und dem *gus*-Reportergen befindet sich eine „Translationale Leader“-Sequenz (TL); ein hellblauer Pfeil symbolisiert das Carbenicillin Resistenz Gen (*bla*).  
 c) Die Nachweisreaktion für Gus Aktivität erfolgt histochemisch. Dazu wurden die Protoplasten auf Filterblättchen übertragen und mit Formaldehyd fixiert; nach Zugabe des farblosen X-Gluc Substraten zeigen blau gefärbte Protoplasten Gus Aktivität an. Spontane Gus Aktivität in Ansätzen ohne *pgus* wurden nicht beobachtet.

In Ansätzen mit *pgus* konnte entschieden werden, ob die jeweiligen Protoplastenpräparation PEG-vermittelten Transformationsansätzen zugänglich waren. Nur bei erfolgreicher DNA-Aufnahme in Ansätzen mit *pgus* war es sinnvoll, mit dem  $\gamma\delta$  Resolvase/*res* System weiter zu arbeiten. Die hier beschriebenen Kontrollreaktionen und die folgenden Arbeiten mit dem  $\gamma\delta$  Resolvase/*res* System wurden in parallelen Ansätzen mit Protoplasten einer Präparation durchgeführt.

### 3.3. Sequenzspezifische Rekombination in Kartoffelprotoplasten mit $\gamma\delta$ Resolvase

In einem ersten Schritt wurden *res*-flankierte Zielplasmide pRxr1*gus*, prxR2*gus*1, pRxr3*gus*, prxr4*gus* und *pgus* als Kontrolle einzeln übertragen und die transient transformierten Protoplasten mit X-Gluc als farbloses Substrat des Gus Enzyms behandelt. Blaufärbung wurde mikroskopisch ermittelt und quantifiziert. Es hat sich gezeigt, dass die Zielplasmide prxR2*gus*1 und pRxr3*gus*, die unmittelbar 5' vor dem *gus*-Reportergen eine 114 bp lange

*res*-Sequenz tragen, zur Blaufärbung von Protoplasten führen (bis zu mehr als 1000 blau gefärbte Protoplasten pro Reaktion). Dagegen zeigten die Zielplasmide pRxr1gus und prxr4gus, die eine 28 bp *res*-Sequenz 5' vor dem *gus*-Gen enthalten, nach Übertragung in Kartoffelprotoplasten keine Gus Aktivität (maximal 3 blau gefärbte Protoplasten pro Reaktion). Die Tests wurden mit Protoplasten der Sorten Jumbo, Ute, Patrona, Rita und Walli durchgeführt. Eine Sortenspezifität konnte nicht festgestellt werden (Tab. 3).

**Tab. 3: Ergebnisse des transienten Testsystems zur Überprüfung der Zielplasmide.**

Kartoffelsorte	Jumbo	Ute	Rita	Walli	Combi	Patrona
pRxr1gus	1	1	1	0	nu	2
prxr2gus1	310	nu	>1000	nu	nu	690
pRxR3gus	750	> 1000	nu	nu	>1000	780
prxr4gus	0	nu	nu	2	0	3
pgus	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Die Zahlen geben die Anzahl der blau gefärbte Protoplasten, nach den Färbung mit dem X-Gluc an. nu bedeutet nicht untersucht.

Das transiente Testsystem in Kartoffelprotoplasten ermöglichte viele Kombinationen der  $\gamma\delta$  Resolvase mit *res*-Zielplasmiden zu prüfen. Die Substratplasmide pRxr1gus, prxr2gus1, pRxR3gus, prxr4gus und die  $\gamma\delta$  Resolvase Expressionsplasmide dieser Arbeit ( $\gamma\delta$ ,  $\gamma\delta$ E102Y,  $\gamma\delta$ E124Q,  $\gamma\delta$ E124K,  $\gamma\delta$ M103I,  $\gamma\delta$ E102YE124Q,  $\gamma\delta$ E102YE124K,  $\gamma\delta$ M103IE124Q,  $\gamma\delta$ M103IE124K) wurden untersucht.

Die  $\gamma\delta$  Resolvase Varianten in Kombination mit pRxr1gus wurde in 8 und mit prxr4gus in bis zu 10 Ansätzen mit Protoplasten unterschiedlicher Kartoffelsorten untersucht (Tab. 4 und 5; im Anhang). Diese Experimenten haben ergeben, dass  $\gamma\delta$  Resolvase mit natürlicher Aminosäureabfolge und die  $\gamma\delta$  Resolvase Variante E102YE124Q in Kartoffelprotoplasten *res*-umgebene DNA-Sequenzen von 2,1 kb Länge aus der Reporterplasmiden entfernen können.

Es wurden in Ansätzen mit pRxr1gus Plasmid und  $\gamma\delta$  Resolvase insgesamt 273 und mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q 179 blau gefärbte Protoplasten erhalten (Tab. 4; im Anhang). Diese Messwerten sind für  $\gamma\delta$  Resolvase signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %. Für die  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q gilt das bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 %,  $\gamma\delta$  Resolvase E124K und M103IE124K zeigen eine signifikante Abweichung der Werte. Es wurden 4 (bei Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %) und 2 (bei 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit) blau gefärbte Zellen im Mittelwert erhalten. Die übrigen Werte weichen nicht signifikant von Messwerten unbehandelten Zellen ab.

Die Kombination prx4gus Substrat mit  $\gamma\delta$  Resolvase führte zu 156 und mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q zu 443 blau gefärbte Protoplasten (Tab. 5; im Anhang). Diese Messwerten sind für  $\gamma\delta$  Resolvase höchst signifikant (0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit).  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q führte zu den Messwerten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit - von 1 %). In Ansätzen mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102Y, M103I, E124Q, E124K, E102YE124K, M103IE24K und M103IE24Q konnte keine statistisch signifikante Aktivierung des *gus*-Reportergens erreicht werden (Tab. 5; im Anhang).

Mit dem Zielplasmid pRxR3gus, das eine 114 bp lange *res*-Sequenz vor dem *gus*-Gen trägt, wurden 10 unabhängige Experimente in Kartoffelprotoplasten durchgeführt. Die Kombination pRxR3gus mit einer funktionellen  $\gamma\delta$  Resolvase (bis zu 3740 blau gefärbte Protoplasten) und mit nicht funktionellen  $\gamma\delta$  Resolvase – Varianten E102Y (3650 blau gefärbte Protoplasten und M103I (1470) hatte keine Wirkung auf die ursprünglich hohe Gus Aktivität des pRxR3gus Vektors alleine. Die Abweichungen vom Mittelwert der Kontrolle sind in diesen Fällen statistisch nicht signifikant. Dagegen wurde die Expression des *gus*-Gens aus pRxR3gus bei Expression der übrigen  $\gamma\delta$  Resolvase – Varianten vermindert. Die Kombination mit M103I führte insgesamt zu 2427 und E124K zu 571 blau gefärbte Protoplasten. Die Mittelwerte sind mit einer 5 %igen Irrtumswahrscheinlichkeit signifikant abweichend von der Kontrolle. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % weicht der Mittelwert von E124Q (192) ab. Höchst signifikant (0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit) sind die starke reduzierte Messergebnisse bei Einsatz der  $\gamma\delta$  Resolvase – Varianten E102YE124K und M103IE124K. Es wurden die Mittelwerte 9 und 46 ermittelt (Tab. 7; im Anhang).

Das Zielplasmid prxR2gus1 führte in Kombination mit verschiedenen  $\gamma\delta$  Resolvase – Varianten in fast allen Ansätzen zu einer starken Unterdrückung der Aktivität des *gus*-Reportergens (Tab. 6; im Anhang ). Es wurde nur eine Ausnahme beobachtet. In der Sorte Jumbo wurden mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102Y 1506 blau gefärbte Protoplasten erzeugt. In Mittelwert ergeben sich für E102Y 251 blau gefärbte Zellen pro Reaktion. Diese Messwerte sind gegenüber der Kontrolle reduziert, aber nicht signifikant. Dagegen führten  $\gamma\delta$  Resolvase M103I und E124Q nur zu 3 blau gefärbten Protoplasten. Ebenfalls mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % weichen die Mittelwerte der Reaktionen mit E102YE124Q, E102YE124K, M103IE124K und M103IE124Q von der Kontrolle ohne  $\gamma\delta$  Resolvase ab. Mit höchster Signifikant weichen die Mittelwerte der  $\gamma\delta$  Resolvase (WT) und E124K ab. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt 0,01 % (Tab. 7; im Anhang).

### 3.4. Erstellung von T-DNA Konstrukten zur anti-sense Hemmung von *GBSS* mit *res*-flankierten Markergensequenzen

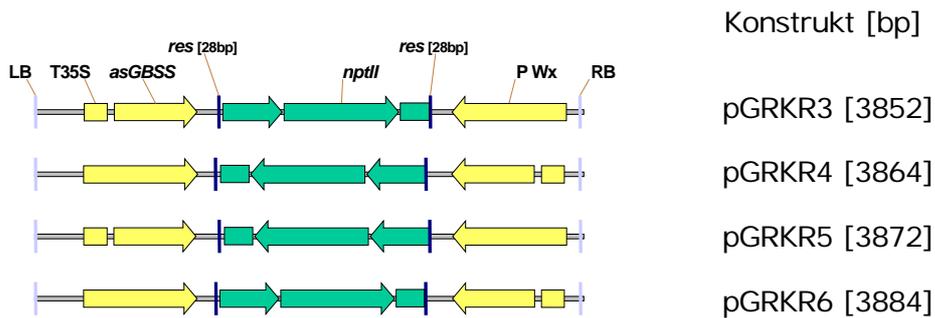
#### 3.4.1. pGRKR Plasmide

Für die Erzeugung transgener Kartoffelpflanzen mit *res*-Sequenzen wurden T-DNA Plasmide hergestellt: pGRKR3, pGRKR4, pGRKR5, pGRKR6. Die Expression von *asGBSS*-Sequenzen sollte zur Hemmung der granulär gebundenen Stärkesynthese führen und die Produktion von Amylose in Kartoffelknolle verhindern. Diese Plasmide tragen jeweils eine im Intron1 des *GBSS*-Gens lokalisierte *res*-Markergenkassette (2.1.6.7.; Abb. 9).

Für die Herstellung der Plasmide pGRKR3-6 wurden die T-DNA Vektoren pMFlp9-3#26 und pMFlp9-4#72 verwendet (M. Reichmann, pers. Mitteilung). Beide Vektoren besitzen *asGBSS*-Sequenzen unter der Kontrolle des 5' regulatorischen *GBSS*-Bereichs (PWx).

Aus dem Plasmid pMFlp9-3#26 wurden rechte Grenzsequenzen der T-DNA (RB), PWx, linke Grenzsequenzen der T-DNA (LB) und *GBSS*-Sequenzen entnommen. Die *res*-Markergenkassette wurde aus den Plasmiden pTopo-rfo2-2#31 und pTopo-rfo1-2#8 isoliert (2.1.6.5.). Die Länge der T-DNA in pGRKR3 ist 3852 bp und die funktionelle Elemente sind folgendermaßen angeordnet: an der LB befindet sich der 35S Terminator, gefolgt von der *asGBSS*-Sequenz. Am 3' Ende der *asGBSS*-Sequenz liegt in 5'→3' Orientierung die *res*-Markergenkassette, an der RB ist PWx lokalisiert (Abb. 9).

Das Plasmid pGRKR5 entspricht dem Plasmid pGRKR3, mit einer 3'→5' Orientierung der *res*-Markergenkassette (Abb. 9). pGRKR6 Plasmid entspricht pGRKR3, mit dem Unterschied, dass RB und *asGBSS*-Sequenzen, LB und regulatorische *GBSS*-Sequenzen aus pMFlp9-4#72 eingesetzt wurden. Hier liegt an der RB in 3'→5' Orientierung die *asGBSS*-Sequenz und an LB der PWx. Die *res*-Markergenkassette liegt in 5'→3' Orientierung vor (Abb. 9). Das Plasmid pGRKR4 entspricht dem Plasmid pGRKR6, mit einer 3'→5' Orientierung der *res*-Markergenkassette relativ zu RB (Abb. 9). Die Details zur Konstruktion von pGRKR3-6 sind im Kapitel 2.1.6.7. beschrieben.



**Abb. 9 : Aufbau der T-DNA aus den Plasmiden pGRKR3-6.**

Die Anordnung der funktionelle Elemente der T-DNA ist maßstabsgerecht dargestellt. Die pGRKR3-6 Plasmide tragen eine Intron-lokalisierte *res*-Markergen-kassette. Gelbe Pfeile symbolisieren den 5' regulatorischen *GBSS*-Bereich (PWx) und *asGBSS*-Sequenzen; die *res*-Markergen-kassette (*nptII*) ist mit grüner Farbe hervorgehoben. Gelbe Vierecke repräsentieren den 35S Terminator (T35S). RB und LB sind mit hellblauen Strichen und die 28 bp *res*-Sequenzen mit blauen Strichen dargestellt. In der Abbildung rechts sind die Namen und die Länge der T-DNA der Plasmide angegeben.

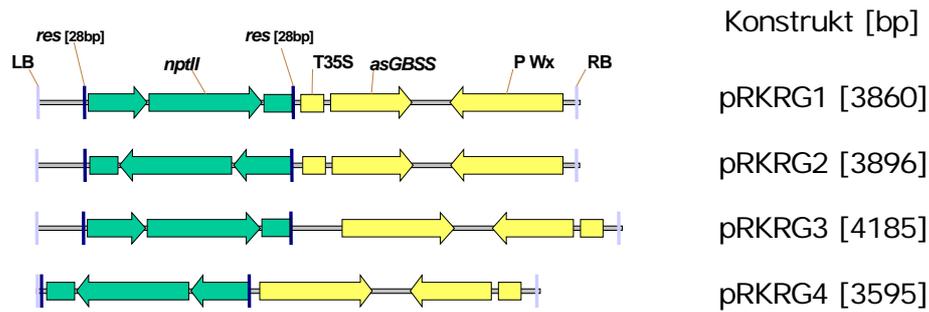
### 3.4.2. pRKRK Plasmide

Es wurden weitere T-DNA Plasmide hergestellt, die eine an der LB lokalisiert *res*-Markergen-kassette tragen (2.1.6.7.). Diese Plasmide wurden mit pRKRK1, pRKRK2, pRKRK3 und pRKRK4 bezeichnet.

Das Plasmid pRKRK1 trägt an der LB die *res*-Markergen-kassette in 5'→3' Orientierung, die *asGBSS*-Sequenz liegt am 3' Ende der *res*-Markergen-kassette in gegenläufiger Orientierung (Abb. 10).

pRKRK2 entspricht dem Plasmid pRKRK1, mit einer 3'→5' Orientierung der *res*-Markergen-kassette (Abb. 10). Bei pRKRK3 stammen PWx, RB, die *asGBSS*-Sequenz und LB aus dem Plasmid pMFlp9-2#48. Am 3' Ende der *res*-Markergen-kassette liegt PWx (Abb. 10). Außerdem befindet sich zwischen der *res*-Markergen-kassette und PWx eine nicht vollständige 10 bp lange LB der T-DNA (es fehlt eine 14 bp lange Teilsequenz (GGCAGGATATATTC)).

pRKRK4 entspricht dem Plasmid pRKRK3, mit einer 3'→5' Orientierung der *res*-Markergen-kassette (Abb. 10). Dieses Plasmid enthält eine nicht vollständige, 14 bp lange LB der T-DNA (es fehlt eine 10 bp lange Teilsequenz (AATTGTAAT)).



**Abb. 10 : Maßstabgerechte Darstellung der T-DNA aus den Plasmiden pRKR1-4.**

Diese Plasmide tragen eine an der LB lokalisierte *res*-Markergenkassette. Im Plasmid pRKR1 liegt am 3' Ende der *res*-Markergenkassette (grün) der 35S Terminator (Vierecke), dann folgen die *asGBSS*-Sequenzen (gelbe Pfeile). Der PWx Promotor (gelbe Pfeile) ist an der RB lokalisiert. Die Markergenkassette (*nptII*) wird von 28 bp langen *res*-Sequenzen (blaue Striche) flankiert; RB und LB sind mit hellblauen Strichen dargestellt. In der Abbildung rechts sind die Namen und die Länge der T-DNA der Plasmide angegeben.

### 3.5. Herstellung transgener *res*-haltiger Kartoffelpflanzen

#### 3.5.1. Übertragung der T-DNA aus den Plasmiden pGRKR und pRKR in das Kartoffelkultivar Walli

Für die Herstellung transgener Pflanzen wurden die beschriebenen T-DNA-Konstrukte mit einem *res*-flankierten *nptII*-Gen in das bayerische Kartoffelkultivar Walli übertragen (2.2.3.). Dazu wurde ein Transformationssystem mit Agrobakterien (GV3101, pMP90RK) eingesetzt (Koncz & Schell, 1986). Es wurden 297 putative transgene Kartoffelpflanzen auf Kanamycin-haltigen Medien regeneriert. Davon stammten 236 Regenerate aus Transformationsansätzen mit pGRKR3-6, 61 Regenerate enthielten T-DNA aus den Plasmiden pRKR1-4. In Tabelle 8 ist die Übersicht der erzeugten transgenen Pflanzen gezeigt.

**Tab. 8: Übersicht der Transformationsexperimente dieser Arbeit.**

pGRKR3	pGRKR4	pGRKR5	pGRKR6	pRKR1	pRKR2	pRKR3	pRKR4
54	59	87	36	16	9	30	6

Die für die Herstellung von transgenen Kartoffeln verwendeten T-DNA Plasmide sind angegeben. Die Zahlen geben die Anzahl der putativen Transformanten an. Insgesamt wurden 297 Linien mit einer *res*-flankierte Markergenkassette erzeugt.

### 3.5.2. Analyse der putativen Transformanden

#### 3.5.2.1. PCR Analyse

232 putativen Transformanden wurden in PCR Ansätzen analysiert. Ob die DNA Isolate zur PCR Amplifikation geeignet waren, wurde jeweils in Ansätzen mit *gbss3* und *gbss4* Primern untersucht, die ein internes *GBSS*-Fragment (415 bp) des genomischen *GBSS*-Locus umgeben. Mit DNA aus 196 Regeneraten als Matrize konnten in PCR Ansätzen transgenspezifische Fragmente amplifiziert werden. In den übrigen 36 Regeneraten konnten keine Fragmente erzeugt werden. 152 Regenerate enthalten T-DNA aus dem Plasmiden pGRKR3-6, die übrigen 44 Regenerate tragen T-DNA aus pRKRG1-4 Plasmiden. In der Tabelle 9 (im Anhang) ist eine Übersicht der PCR Analysen der untersuchten transgenen Pflanzen aus Transformationsansätzen mit pGRKR3-6 und pRKRG1-4 Plasmiden dargestellt.

Die Transformanden, die T-DNA aus den Plasmiden pGRKR3 und pGRKR4 tragen, wurden in einer PCR mit der Primerkombination *ag1+neo1* untersucht. Es wurde bei 75 Regenerate ein 1248 bp Fragment amplifiziert (Tab. 9; im Anhang). Dieses Fragment enthält eine 28 bp lange *res* Site I, dem 5' Bereich *nptII*-Gen und den T35S.

Die Transformanden, die eine T-DNA aus den Plasmiden pGRKR5 und pGRKR6 tragen, wurden in einer PCR mit der Primerkombination *ag1+neo2* untersucht. Es konnte bei 77 Pflanzen ein 1311 bp Fragment amplifiziert werden (Tab. 9). Dieses Fragment enthält ein 28 bp langes *res* Site I, dem 5' Bereich *nptII*-Gens und den 35S Promotor.

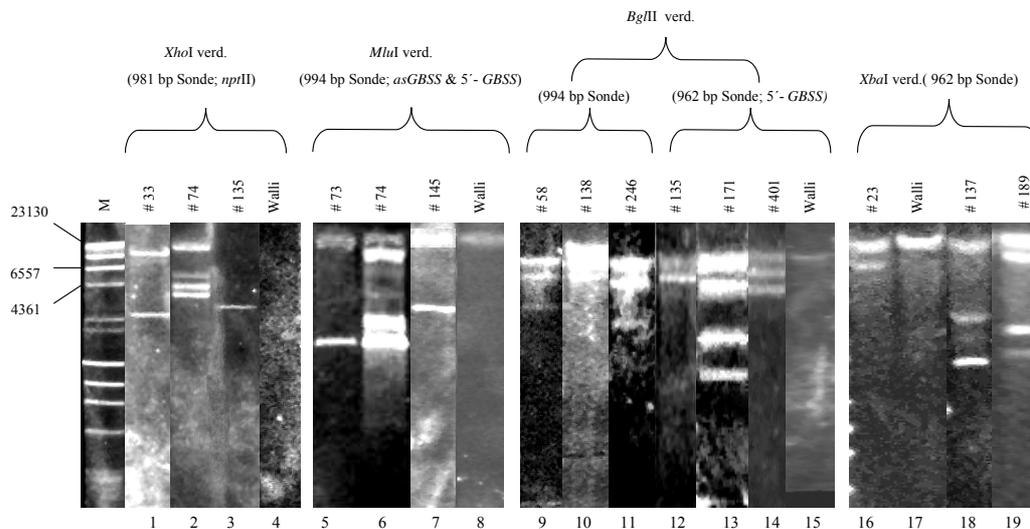
Um die PCR Ergebnisse abzusichern, wurde weitere PCRs mit einer transgenspezifischen Primerkombination *ag1+/ag1-* durchgeführt. Aus 152 Transformanden wurde bei 101 Transformanden ein > 2 kb langes *ag1+/ag1-* Fragment nachgewiesen (Tab. 9, diese Primerkombination ist mit dem Y gezeigt; im Anhang). Dieses Fragment enthält *asGBSS*-Sequenzen und die *res*-flankierte Kanamycinkassette. Die Primern *ag1+/ag1-* ergeben bei DNA Isolaten aus Transformationsansätzen mit pGRKR3 und pGRKR4 ein 2451 bp langes Fragment, bei Regeneraten aus Transformationsansätzen mit pGRKR5 und pGRKR6 ein 2471 bp langes Fragment.

Die Transformanden, die einen T-DNA aus den Plasmiden pRKRG1-4 tragen, wurden in PCR Ansätzen mit den Primern *ag1+/ag2-* untersucht. Diese Primerkombinationen amplifizieren aus dem pRKRG1-4 Linien 767 bp (*ag1+/ag2-*) 3' Bereich der *asGBSS*-Sequenzen. Ein Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 9 gezeigt (im Anhang).

### 3.5.2.2. Southern blot-Analyse

158 durch PCR ausgewählte *res*-haltige transgene Kartoffelpflanzen wurden mittels Southern blot untersucht. Ziel war es, transgene Pflanzen zu identifizieren, die eine Kopie des Transgens tragen.

Es wurde genomische DNA aus 48 ausgewählten pGRKR3-6 Linien mit dem Restriktionsenzym *Xho*I behandelt, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Filter-Matrix übertragen und mit der *npt*II 981 bp Sonde (2.3.4.) hybridisiert (Abb. 11; Tab. 10; im Anhang). In der Kontrolle (Ausgangsorte Walli) wurden keine *npt*II-Fragmente detektiert (Abb.11; Spur 4).



**Abb. 11 : Southern blot-Analyse von transgenen Linien mit T-DNA aus pGRKR3-6.**

*Xho*I behandelte DNA der Linien #33, #74, #135 und Ausgangsorte Walli (Spur 1, 2, 3 und 4) wurde mit einer 981 bp Sonde hybridisiert. Die DNA aus den Linien #73, #74, #145 und Walli (Spur 5, 6, 7 und 8) wurde mit *Mlu*I, die DNA den Linien #58, #138, und #246 (Spur 9, 10 und 11) mit *Bgl*III geschnitten und mit einer 994 bp Sonde untersucht.

Mit *Bgl*III behandelte DNA aus den Linien #135, #171, #401 und Walli (Spur 12, 13, 14 und 15) und mit *Xba*I geschnittene DNA der Linien #23, #137, #189 und Walli (Spur 16, 17, 18 und 19) wurde mit der 962 bp Sonde hybridisiert.

Die Linien #23, #73, #135 und #145 zeigen in diese Analysen eine transgenspezifische Bande; die Linien #33, #58, #137, #138 und #401 zeigen wenigstens zwei Bande des Transgens und die Linien #74, #171, #189 und #246 enthalten mehr als drei Kopien des Transgens.

In den Spur 8 und 17 wird ein hochmolekulares *Mlu*I oder *Xba*I, in der Spur 15 ein etwa 6,5 kb *Bgl*III Genfragment des genomischen *GBSS*-Locus hybridisiert und in der Spur 4 wird kein Genfragment Detektiert aus dem genomischen Locus.

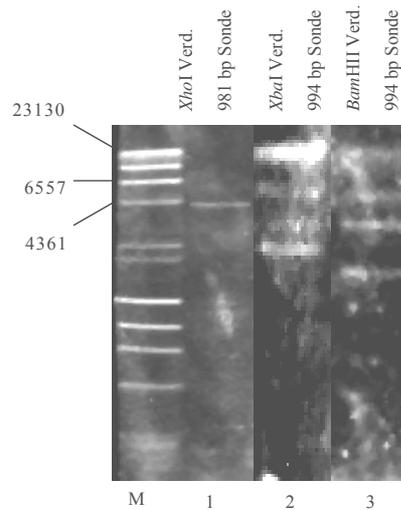
Die Linien #23, #33, #135, #137, #171 und #401 tragen T DNA aus pGRKR3; die Linien #58, #73, #74 und #246 besitzen T-DNA aus pGRKR6, die Linien #138 und #145 enthalten T-DNA aus pGRKR4 und die Linie #189 trägt T-DNA aus pGRKR5.

Der Nachweis von T-DNA enthaltenden transgenen pGRKR3-6 Linien erfolgte über die Verwendung von zwei Sonden (2.3.4.): Die 994 bp Sonde (bindet an *asGBSS* und den entsprechenden endogenen Bereich 5' *GBSS*) und 962 bp Sonde (erkennt regulatorischen 5' Bereich von *GBSS*). Die DNA aus der Linien mit T-DNA aus pGRKR3 und pGRKR5 wurde mit *XbaI* geschnitten und mit der 962 bp Sonde untersucht. Die genomische DNA aus der transgenen Linien pGRKR4 und pGRKR6 wurde mit der Enzym *MluI* restringiert und mit der 994 bp Sonde hybridisiert (Abb. 11; Tab.10; im Anhang). Southern-Experimente mit *MluI*, bzw. *XbaI*-geschnittener genomischer DNA der Ausgangsorte Walli zeigten, dass sich mittels dieser Sonden die entsprechenden Sequenzen als jeweils ein hochmolekulares Genfragment im Blot nachweisen lassen (z.B. Abb. 11; Spur 8 und 17). Zwei Fragmente bedeuten, dass die betreffenden Linien eine Bande des Transgens enthalten, die eine Bande der genomischen *GBSS*-DNA entspricht. Es wurden mit der 994 bp Sonde 43 und mit dem 962 bp Sonde 54 Linie untersucht (Tab. 10; im Anhang).

Es wurden zudem Southern-Experimente mit *BglII* behandelte genomischer DNA durchgeführt. *GBSS*-Sonden (962 bp und 994 bp Fragmente) erkennen hier ein etwa 6,5 kb großes Fragment aus *GBSS* (Abb. 11; Spur 10; im Anhang).

Mit *BglII* behandelte genomischer DNA der 25 Linien mit T-DNA aus pGRKR4 und pGRKR6 wurde mit einer 994 bp Sonde geprobt (Abb. 11; Tab. 10; im Anhang). und DNA der 38 Linien mit T-DNA aus pGRKR3 und pGRKR5 mit eine 962 bp Sonde Hybridisiert (Abb. 11; Tab. 10; im Anhang).

Nicht immer sind die Ergebnisse aus unterschiedlichen Southern blot-Analysen einheitlich. Eine mit der 981 bp Sonde durchgeführte Southern blot-Analyse der mit *XhoI* behandelte DNA der Linie #97 hat ergeben, dass diese Linie eine Bande des Transgens trägt (Tab.10; im Anhang). Um das Ergebnis zu überprüfen wurde DNA aus der Linie #97 mit a) *BamHI* und b) *XbaI* restringiert und mit einer 994 bp Sonde hybridisiert. Mit diesen Southern blot-Analysen wurde gezeigt, dass die Linie #97 mindestens drei Banden des Transgens besitzt (Abb. 12).



**Abb. 12 : Southern blot-Analyse der transgenen Linie #97 mit T-DNA aus pGRKR6.**

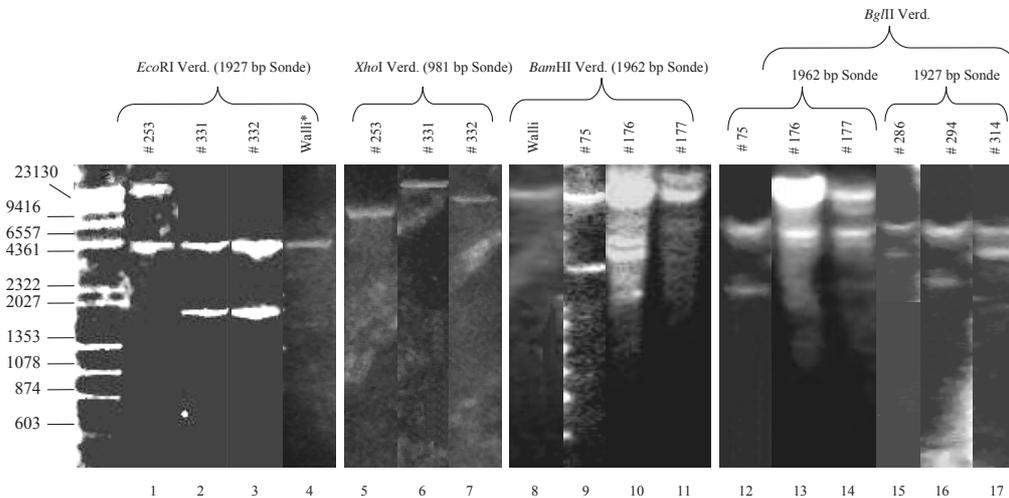
Mit *XhoI* behandelte DNA (Spur 1) wurde mit der 981 bp Sonde, mit *XbaI* (Spur 2) und *BamHI* (Spur 3) restringierte DNA mit einer 994 bp Sonde hybridisiert. Die Linie #97 zeigt in erste Spur eine, in zweite und dritte wenigstens drei transgenspezifische Bande.

Zusammenfassend hat die Southern blot-Analyse ergeben, dass aus 110 untersuchten pGRKR3-6 Linien 49 Linien vermutlich eine Bande des Transgens tragen, 23 Linien enthalten zwei und 9 Linien mehrere Banden des Transgens. Bei 34 transgenen Pflanzen konnte die Anzahl der Transgenbanden nicht bestimmt werden.

Für die Untersuchung der Pflanzen mit T-DNA aus pRKR1-4 wurden die Sonden 1927 bp und 1962 bp (2.3.4.) ausgewählt. Beide erkennen *asGBSS*-Sequenzen und PWx Promotor. Die genomische DNA der Linien mit T-DNA aus pRKR1 und pRKR3 wurde mit *EcoRI* behandelt und mit der 1927 bp Sonde hybridisiert (Abb. 13; Tab. 11; im Anhang), genomische DNA der Linien mit T-DNA aus pRKR2 und pRKR4 Plasmiden wurde mit *BamHI* behandelt und mit der 1962 bp Sonde untersucht (Abb. 13; Tab. 11; im Anhang). Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden Southern blot-Experimente mit *BglIII* behandelter genomischer DNA von Walli durchgeführt (Kontrollreaktion in ist Abb. 11; Spur 15 gezeigt). Die Southern blot-Analysen mit der Ausgangsorte Walli (Kontrollreaktion) haben ergeben, dass die DNA-Restriktion mit *EcoRI* ein ca. 4,3 kb langes (Abb. 13; Spur 4) und *BglIII* ein etwa 6,5 kb großes (Abb.11; Spur 10) Genfragment ergeben. Die DNA-Restriktion mit *BamHI* ergibt ein hochmolekulares Genfragment, das dem *GBSS*-Locus entspricht (Abb. 13; Spur 8).

Southern blot-Experimente der untersuchten pRKR1-4 Linien ergab, dass die Pflanzen #75, #177, #253, #331 und #332 vermutlich eine Kopie des Transgens enthalten, da nur eine transgenspezifische Bande detektiert werden konnte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 (im Anhang) zusammengefasst.

Zur weiteren Analyse wurde die DNA der betreffenden Linien mit einer Transgenkopie mit *XhoI* behandelt (Abb. 13). Die Detektion des Transgens erfolgte mit einer 981 bp Sonde (*nptII*; Tab. 11; im Anhang). Diese Untersuchung konnte die vorhergehenden Ergebnisse mit den Linien #75, #177, #253, #331 und #332 bestätigen (Abb. 11).



**Abb. 13 : Southern blot-Analyse von transgenen Linien mit T-DNA aus pRKR1-4.**

Mit *EcoRI* restringierte DNA der Linien #253, #331, #332 und der Ausgangssorte Walli (Spuren 1, 2, 3 und 4) und mit *BglIII* behandelte DNA der Linien #286, #294 und #314 (Spuren 15, 16 und 17) wurden mit einer 1927 bp Sonde untersucht. Die DNA den Linien #253, #331 und #332 (Spuren 5, 6 und 7) wurde mit *XhoI* behandelt und mit einer 981 bp Sonde hybridisiert. Die genomische DNA aus Walli und aus den Linien #75, #176 und #177 in Spuren 8, 9, 10 und 11 wurde mit *BamHI* und in Spuren 12, 13 und 14 mit *BglIII* behandelt und mit einer 1962 bp Sonde untersucht. Die Linien #75, #177, #253, #286, #294, #314, #331 und #332 zeigen eine Bande des Transgens, die Linie #176 enthält mehrere Banden des Transgens. In Spur 4 wird ein etwa 4,3 kb *EcoRI* Fragment und in Spur 8 ein hochmolekulares *BamHI* Genfragment aus dem *GBSS*-Locus hybridisiert.

### 3.5.2.3. Analyse der Stärkequalität im Jod-Stärke-Test

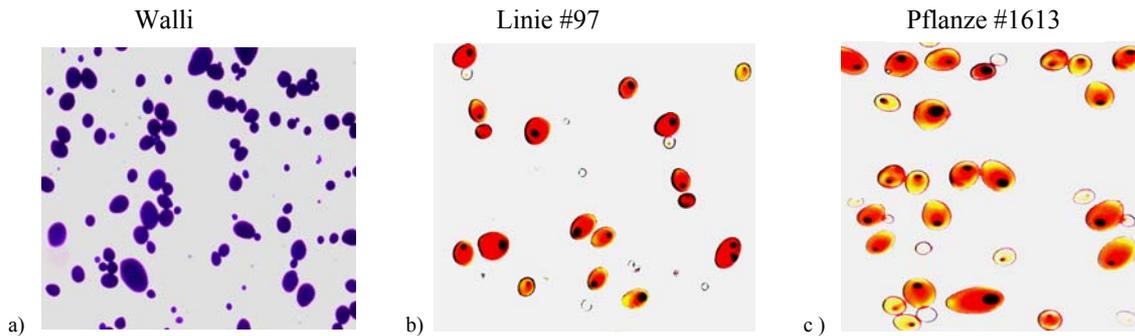
Für die Überprüfung der Stärkequalität wurden *in vitro*-Knollen aus transgenen Kartoffelpflanzen erzeugt (2.7.). Dann wurde ein Stärketest mit Lugol's Lösung durchgeführt (2.9.). Rote Färbung der Stärkekörner weist auf eine starke Reduzierung des Amyloseanteils in den Stärkekörner hin und zeigt die Aktivität der eingeführten *GBSS*-Sequenzen bei der posttranskriptionalen Hemmung der granulär gebundenen Stärkesynthese (Abb. 14b und 14c zeigt Stärkekörner aus gentechnisch veränderten Pflanzen mit überwiegendem Amylopektinanteil). Eine blaue Färbung deutet auf die native Form der Stärke mit Amyloseanteil hin (Abb. 14a). Von 220 untersuchten Knollen trugen 50 T-DNA aus den Plasmiden pRKR1-4, 170 besaßen T-DNA aus den Plasmiden pGRKR3-6 (Tab. 12; im Anhang).

Tab. 12. Analyse der Stärkequalität im Jod-Stärke-Test .

T-DNA Plasmid zur Erzeugung der untersuchten Pflanzen	Anzahl der analysierten Knollen	Stärke mit Amyloseanteil	Stärke mit erhöhten Amylopektinanteil
pGRKR3	45	45	
pGRKR4	35	35	
pGRKR5	40	40	
pGRKR6	50	49	1 (#97)
pRKR1	14	14	
pRKR2	4	4	
pRKR3	27	20	7 (#50, #253, #279, #280, #331, #332, #394)
pRKR4	5	5	

Die verwendeten T-DNA Plasmide zur Erzeugung der untersuchten Pflanzen sind angegeben. Die Zahlen zeigen die Anzahl der untersuchte Knollen der jeweiligen Pflanzen im Jod-Stärke-Test. Es wurde 10 Knollen der Linie #97 und 5 Knollen der Linien #50, #253, #279, #280, #331, #332 und #394 getestet. Linien mit erhöhten Amylopektinanteil sind in Klammern angegeben.

Außer der Linie 97 wiesen alle untersuchten pGRKR3-6 Linien im Jod-Stärke-Test die native Form der Stärke auf. Die Linie 97 hingegen zeigt eine rote Färbung, vermutlich bedingt durch den erhöhten Anteil an Amylopektin. Diese Linie enthält nach den durchgeführten Southern blot-Analysen mit nicht einheitlichen Ergebnis eine bis drei Transgenkopie der T-DNA aus dem Plasmid pGRKR6 (3.5.2.2.).



**Abb. 14 : Stärkekörner im Jod-Stärke-Test.**

In Abbildung a sind blau gefärbte Stärkekörner der Ausgangsorte Walli dargestellt, die Färbung weist auf die native Form der Stärke mit Amyloseanteil hin;  
Die rot gefärbten Stärkekörner der Linie #97 bzw. #1613 (Regenerate der Linie #97; 3.10.2.) in Abbildung b bzw. c weisen auf einen erhöhten Amylopektinanteil in den Knollen der transgenen Pflanze hin.

Bei Pflanzen mit T-DNA der Plasmide pRKRG1, pRKRG2 und pRKRG4 wurden ausschließlich Knollen mit Amylose analysiert. Die Jod-Reaktion ergab in diesen Fällen blaue Stärkekörner ohne Unterschied zur Ausgangspflanze. Von insgesamt 27 Pflanzen aus Transformationen mit pRKRG3 wurden bei den Linien #50, #253, #279, #280, #331, #332 und #394 rote Färbung der Stärkekörner nach Behandlung von Stärkekornpräparationen der Knollen mit Lugol's Lösung hervorgerufen. Southern blot-Analysen ergaben, dass die Linien #50 und #280 zwei und die Linien #253, #279, #331, #332 und #394 eine Kopie des Transgens enthalten (Tab. 10; im Anhang).

### 3.6. *res*-haltige T-DNA als Substrat der Rekombination durch die $\gamma\delta$ Resolvase

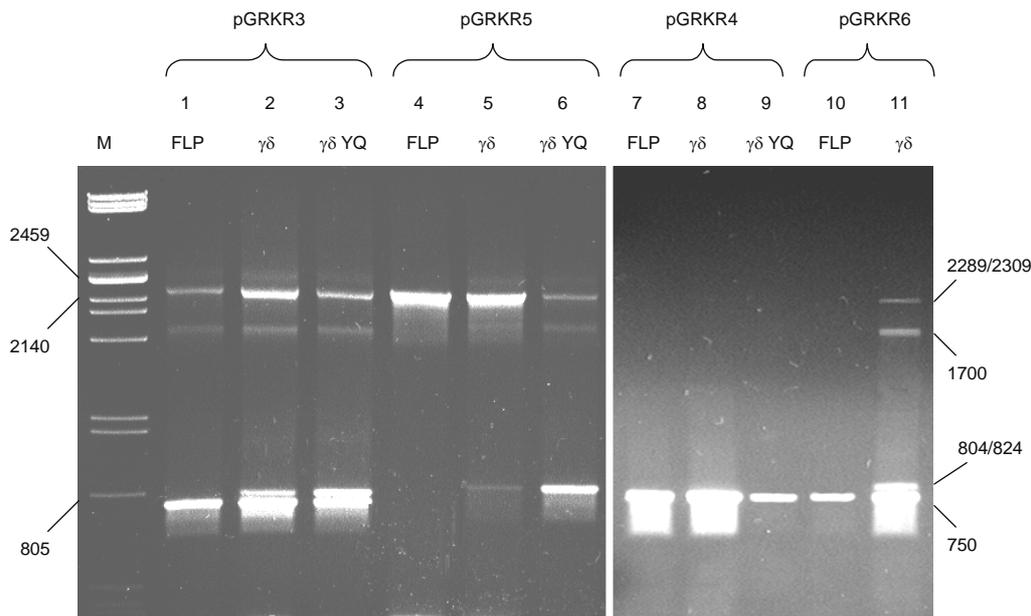
#### 3.6.1. pGRKR Plasmide als episomale Substrate mit *res*-Sequenzen

Um zu klären, ob sich die hergestellten T-DNA Plasmide mit *res*-Sequenzen durch  $\gamma\delta$  Resolvase rekombinieren lassen, wurden pGRKR3-6 Plasmide (3.4.1.) im transienten Testsystem untersucht.

Das transiente Testsystem bestand in der Übertragung folgender Konstrukte in Kartoffelprotoplasten: pGRKR3-6 Plasmide jeweils in Kombination mit  $\gamma\delta$  oder  $\gamma\delta$ E102YE124Q (3.1.4.), sowie das pFLP Plasmid in Kontrollreaktionen. Nach 2 Tagen Regeneration erfolgte die Analyse der aus den behandelten Kartoffelprotoplasten isolierten DNA (2.3.2.) mit PCR.

Für die PCR wurden die Primer ag1+ und ag2- (2.1.7.) ausgewählt. Diese umspannen das *asGBSS*-Konstrukt (2.1.7.). Erfolgte in den Kartoffelprotoplasten die sequenzspezifische Rekombination durch die  $\gamma\delta$  Resolvase, wurde die *res*-flankierte Markergen-kassette ausgeschnitten. Zurück bleiben *GBSS*-Sequenzen und eine 28 bp lange *res*-Sequenz. In diesem Fall sollte ein 804 bp (pGRKR3 und pGRKR4 als Matrize) bzw. 824 bp (pGRKR5 und pGRKR6 als Matrize), markerfreies Fragment amplifiziert werden können. Nicht rekombinierte Ausgangssequenzen führen mit ag1+/ag2- Primern zu langen (> 2 kb) Amplikons. Mit Plasmid pGRKR3 und pGRKR4 DNA als Matrize ergeben die Primer ag1+/ag2- ein 2289 bp Fragment, bei pGRKR5 und pGRKR6 als Matrize ein 2309 bp Fragment, das noch die *nptII*-Sequenzen enthält. In der Reaktionen mit Plasmiden pGRKR3, pGRKR4 und pGRKR6 als Matrize amplifizieren die Primer ag1+/ag2- ein unspezifisches Fragment von etwa 750 bp Länge. In einer vergleichbaren PCR mit pGRKR5 Plasmid als Matrize tritt dieses Fragment nicht auf. Die *res*-Sequenzen sind keine Erkennungsstellen der FLP Rekombinase. Daher wurde diese zur Bestimmung einer möglichen unspezifischen Hintergrundreaktion des Systems herangezogen.

Die  $\gamma\delta$  Resolvase und  $\gamma\delta$  Resolvase  $\gamma\delta$ E102YE124Q können die untersuchten pGRKR3 und pGRKR5 Plasmide als episomales Substrat nutzen und *res*-flankierte DNA-Sequenzen ausschneiden. Es wurden markerfreie *GBSS*-Genfragmente von 804 bzw. 824 bp Länge amplifiziert. Die Ergebnisse wurden durch Wiederholung verifiziert. Die  $\gamma\delta$  Resolvase kann auch pGRKR6 als episomales Substrat für eine erfolgreiche sequenzspezifische Rekombination nutzen (einmaliger Versuch). Die transiente Transfektion und Expression der  $\gamma\delta$  Resolvase oder  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q in Kombination mit pGRKR4 (zweimal durchgeführt), und pGRKR6 in Kombination  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q (einmaliger Versuch, nicht gezeigt) führte nicht zu markerfreien Sequenzen. In keinem der Reaktionsansätze mit FLP Rekombinase und T-DNA *res*-Substraten konnten die entsprechenden Fragmente einer sequenzspezifischen Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase nachgewiesen werden (Abb. 15).



**Abb. 15 : Analyse der Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase bei transient eingeführter T-DNA aus pGRKR3-6 Plasmiden.**

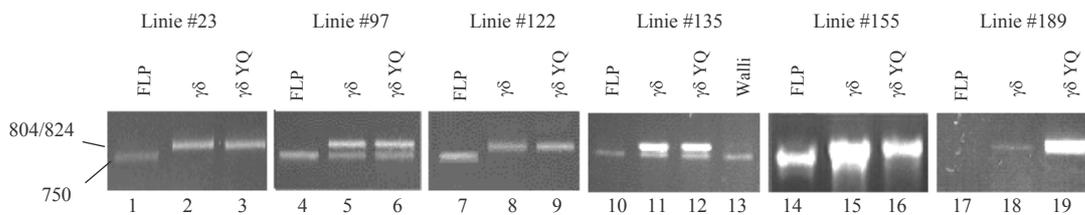
PCR Analyse von DNA aus Protoplasten mit pGRKR3-6 Plasmiden nach Behandlung mit FLP (Spur 1; 4; 7; 10; Kontrollreaktion), mit  $\gamma\delta$  Resolvase ( $\gamma\delta$ ; Spur 2; 5; 8; 11) und mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q ( $\gamma\delta$  YQ; Spur 3; 6; 9). Die T-DNA stammte in den Spuren 1; 2 und 3 aus dem Plasmid pGRKR3, in den Spuren 4; 5 und 6 aus dem Plasmid pGRKR5, in den Spuren 7; 8 und 9 aus dem pGRKR4 und in Spuren 10 und 11 aus dem pGRKR6. Nach transienter Transfektion und Expression der  $\gamma\delta$  Resolvase oder FLP Rekombinase für zwei Tage wurde aus den Ansätzen DNA isoliert und in PCR-Analysen untersucht. Die Primern ag1+/ag2- amplifizierten ein 804 bp (pGRKR3 als Matrize) bzw. 824 bp (pGRKR5 und pGRKR6 als Matrize) *res*-markerfreies Fragment in den PCRs. Die *res*-flankierten Markergenkassette entspricht (bei pGRKR3 einem 2286 bp Fragment, bei pGRKR5 und pGRKR6 einem 2309 bp Fragment). Es tauchen in den Reaktionen reproduzierbar zwei nichtspezifische Fragmente auf: ein etwa 750 bp (in den Spuren 1; 2; 3; 7; 8; 9; 10 und 11) und ein etwa 1700 bp großes (in den Spuren 1, 2, 3, 6 und 9) Fragment unbekannter Herkunft.

### 3.6.2. Genomisch integrierte T-DNA mit *res*-Markergensequenzen als Ziel sequenzspezifischer Rekombination

Um zu zeigen, dass  $\gamma\delta$  Resolvase und die  $\gamma\delta$  Resolvase Variante E102YE124Q in den Zellkern integrierte T-DNA mit *res*-Markergensequenzen als Ziel sequenzspezifischer Rekombination nutzen können, wurden aus Blättern transgener Pflanzen mit T-DNA aus dem pGRKR3-6 Plasmiden, Protoplasten isoliert und mit  $\gamma\delta$  Resolvase und  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q Expressionsplasmiden behandelt (2.4.2.). Nach Regeneration wurde aus diesen Ansätzen DNA isoliert (2.3.) und mittels PCR analysiert. Zum Nachweis markerfreier *res*-Fragmente wurden die Primer ag1+ und ag2- verwendet.

Es wurden 17 Linien mit T-DNA aus pGRKR3-6 Plasmiden untersucht: #17, #23, #29, #57, #61, #82, #93, #97, #105, #119, #122, #125, #135, #137, #155, #189, #191. Nach Behandlung der transgenen Linien mit  $\gamma\delta$  Resolvase oder  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q Expressionsplasmiden wurden bei den Linien #23, #97, #122, #135, #155 und #189 *res*-markerfreie Fragmente mittels PCR nachgewiesen. Es wurden 804 bp (bei den Linien #23, #135 als Matrize) oder 824 bp (bei den Linien #97, #122, #155 und #189 als Matrize), markerfreie Fragmente nachgewiesen.

In PCR Ansätzen der Linie #189 wurden kein unspezifisches Fragment amplifiziert. Dagegen wurde in alle Reaktionen mit den Linien #135 und #97 ein 750 bp langes unspezifisches Fragment amplifiziert. Dieses Fragment taucht auch bei der Ausgangsorte Walli auf. Die Linien #23, #122 und #155 erzeugen unspezifische Fragmente nur in Kontrollreaktionen mit FLP Rekombinase. In den PCR Ansätzen mit FLP Rekombinase konnten erwartungsgemäß keine rekombinanten Produkte beobachtet werden, ebenso wenig in PCR Ansätzen aus Pflanzen, die nicht mit einer Rekombinase behandelt wurden (Abb. 16).



**Abb. 16 : Analyse der Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase bei genomisch integrierten *res*-Substraten.**

PCR Analyse der DNA aus Protoplasten der transgenen Linien #23, #97, #122, #135, #155 und #189 nach Behandlung mit FLP Rekombinase (Kontrollreaktion), mit  $\gamma\delta$  Resolvase und mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q Expressionsplasmiden.

Das mit den Primern ag1+/ag2- amplifizierte 804 bp langes *res*-markerfreie Fragment ist in Spuren 2, 3, 11 und 12 und ein 824 bp großes Fragment in Spuren 5, 6, 8, 9, 15, 16, 18 und 19 zu sehen. Das etwa 750 bp unspezifische Fragment wird auch in Ansätzen mit genomischer DNA aus Walli amplifiziert (Spur 13).

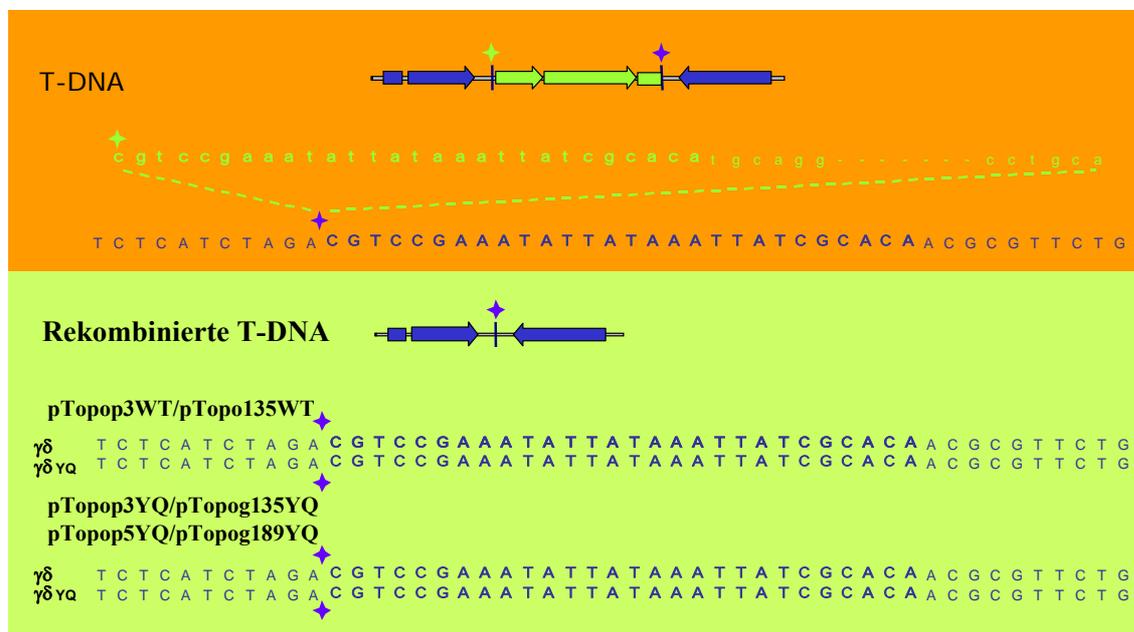
### 3.6.3. Sequenzanalyse markerfreier *res*-Amplikons

Die  $\gamma\delta$  Resolvase kann *res*-Markergensequenzen als Ziel sequenzspezifischer Rekombination nutzen, um DNA-Sequenzen aus episomalen Substraten und aus dem Genom von Kartoffelpflanzen auszuschneiden (3.6.1. und 3.6.2.). Um zu überprüfen, ob die markerfreien Fragmente die erwartete Sequenzabfolge zeigen, wurden rekombinierte Fragmente aus den PCR-Ansätzen 2, 3 und 6 (3.6.1. Abb. 15) und 11, 12 und 19 (3.6.2. Abb. 16) isoliert und in den Vektor pCR4-TOPO (Invitrogen) kloniert. Die pCR4-TOPO Plasmide, die das durch  $\gamma\delta$  Resolvase 804 bp rekombinierte Fragment aus transienten Ansätzen mit dem pGRKR3 Plasmid oder aus der Linie #135 enthalten, wurden als pTopop3WT bzw. pTopog135WT bezeichnet.

Die Plasmide, die das durch  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q 804 bp rekombinierte Fragment aus transienten Ansätzen mit dem pGRKR3 Plasmid oder aus der Linie #135 enthalten, wurden als pTopop3YQ bzw. pTopog135YQ bezeichnet.

Die Plasmide, die das durch  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q 824 bp rekombinierte Fragment aus transienten Ansätzen mit dem pGRKR5 Plasmid oder aus der Linie #189 enthalten, wurde als pTopop5YQ bzw. pTopog189YQ bezeichnet.

Die Sequenzen der rekombinierten Produkte wurden bei jeweils drei unabhängigen Klonen überprüft. In den untersuchten Sequenzierungsansätzen wurden keine Abweichungen von der erwarteten Basenpaarabfolge eines Rekombinationsproduktes der  $\gamma\delta$  Resolvase beobachtet (Abb. 17). Die rekombinierten T-DNA Bereiche enthielten nur noch eine 28 bp *res*-Sequenz. Die Markergensequenzen wurden vollständig entfernt und die *GBSS*-Sequenzen korrekt miteinander verknüpft.



**Abb. 17 : Sequenzanalyse markerfreier *res*-Amplikons.**

Im orangenen Abschnitt ist ein Ausschnitt aus dem Plasmid pGRKR3 dargestellt; blaue Pfeile symbolisieren den  $PW_x$  Promotor und *asGBSS*. Zwischen dem Promotor und der *asGBSS*-Sequenz befindet sich die *res*-flankierte Markergenkassette. Grüne und blaue Kreuze symbolisieren die 28 bp langen *res*-flankierten DNA-Sequenzen.

Im grünen Abschnitt sind *res*-markerfreie Fragmente gezeigt; mit blauen Kreuzen ist die 28 bp lange *res*-flankierte DNA-Sequenz dargestellt.

Ein Sequenzvergleich markerfreier *res*-Amplikons zeigt, dass sowohl die  $\gamma\delta$  Resolvase als auch  $\gamma\delta$ E102YE124Q auf Episom- und Genomebene sequenzspezifisch rekombinieren.

Die 28 bp *res*-Sequenz ist fett dargestellt. Ein 804 bp markerfreies Fragment enthalten die Plasmide: pTopop3WT oder pTopog135WT aus pGRKR3 oder der Linie #135 nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase und pTopop3YQ oder pTopog135YQ aus pGRKR3 oder der Linie #135 nach Behandlung mit bzw.  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q.

pTopop5YQ bzw. pTopog189YQ enthalten ein 824 bp markerfreies Fragment aus pGRKR5 bzw. aus der Linie #189 nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q.

### 3.7. Transiente Expression der $\gamma\delta$ Resolvase zur gezielten Entfernung von *res*-Markergensequenzen und Erzeugung markerfreier Pflanzen

Die Expression der  $\gamma\delta$  Resolvase in Protoplasten ist ein möglicher Weg zur gezielten Entfernung von *res*-Markergensequenzen. Auf diese Weise können markerfreie Protoplasten erhalten werden, aus denen sich markerfreie Pflanzen regenerieren lassen könnten.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die in Tabelle 13 angegebenen transgenen Linien mit  $\gamma\delta$  Resolvase und mit  $\gamma\delta$ E102YE124Q transient behandelt (3.2.).

**Tab. 13: Anzahl der transienten Transformationsansätze im Protoplastensystem für eine gezielte Entfernung von *res*-Markergensequenzen durch  $\gamma\delta$  Resolvase.**

Linien	#17	#23	#57	#93	#97	#135	#189	#253	#331	#332
$\gamma\delta$	4	4	7	1	28	8	1	4	3	1
$\gamma\delta$ YQ	3	3	6	1	27	8	2	4	3	2

Die Anzahl der transienten Transformationsansätze in Protoplasten der angegebenen Linien mit  $\gamma\delta$  Resolvase ( $\gamma\delta$ ) und mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q ( $\gamma\delta$ YQ) ist angegeben.

Insgesamt konnten aus diesen Ansätzen 1700 Pflanzen erzeugt werden. Diese Pflanzen sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

**Tab. 14: Regenerate aus transgenen Linien nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase.**

Linien	#17	#23	#57	#93	#97	#135	#189	#253	#331	#332
$\gamma\delta$	90	85	30	45	171	174	53	90	44	50
$\gamma\delta$ YQ	83	50	50	50	280	100	95	50	30	80

Die Zahlen zeigen, dass insgesamt 1700 Regenerate nach Behandlung der jeweiligen Linien mit  $\gamma\delta$  Resolvase bzw.  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q erzeugt wurden.

### 3.8. Untersuchungen der Sensitivität von Kartoffelpflanzen gegenüber Kanamycin

Ausgewählte Pflanzen wurden parallel auf MS und MS+Kanamycin Medien vermehrt (2.1.8.1. und 2.1.8.2.). Markerfreie Pflanzen sollten in Anwesenheit des Antibiotikums Kanamycin nicht wachsen, wohingegen auf MS-Medium ohne Kanamycin das Wachstum der Pflanzen nicht behindert wird (Abb. 18). Mit dieser Methode wurden 490 Pflanzen untersucht. Eine Übersicht über die durchgeführten Experimente ist in Tabelle 15 gezeigt.

**Tab. 15: Untersuchung auf MS+Kanamycin Nährmedium zur Auswahl markerfreier Pflanzen.**

Linien	#17	#23	#57	#97	#135	#189	Summe
$\gamma\delta$	11	28	19	95	109	58	321
$\gamma\delta$ YQ	26	6	112	11	15	170	

Für die Erzeugung markerfreier Pflanzen wurden die *res*-markerhaltigen Linien #17, #23, #57, #97, #135 und #189 eingesetzt. Die Zahlen zeigen die Anzahl der untersuchte Pflanzenregenerate nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase bzw.  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q - auf MS+Kanamycin Nährmedium.

a)



b)

**Abb. 18 : Wachstum einer Kartoffelpflanze auf MS und MS+Kanamycin Nährmedium.**

Die Blattbildung der Pflanze (Regenerate #1613) wurde auf MS+Kanamycin Medium gestört (b). Zum Vergleich die Blattbildung der Pflanze auf MS Medium (a).

In diesen vergleichenden Untersuchungen konnten 50 Pflanzen identifiziert werden, deren Blattbildung auf MS+Kanamycin Medium gestört sind (Tab. 16).

**Tab. 16: Die Pflanzenregenerate, nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase zur Entfernung von *nptII*-Gen, deren Blattbildung auf MS+Kanamycin Nährmedium gestört ist.**

Linien	#17	#23	#97	#135	#189
$\gamma\delta$		213;214	13;14;15;17;18;23;28;45;46;47; 48;52;53;54;56;64;66;71;72;85; 87;88; 89;90;92;97;98	44;129;141;143;145; 152;164;163;291;289	194;203
$\gamma\delta$ YQ	321;322		103;104;124;345;346;1613	252	

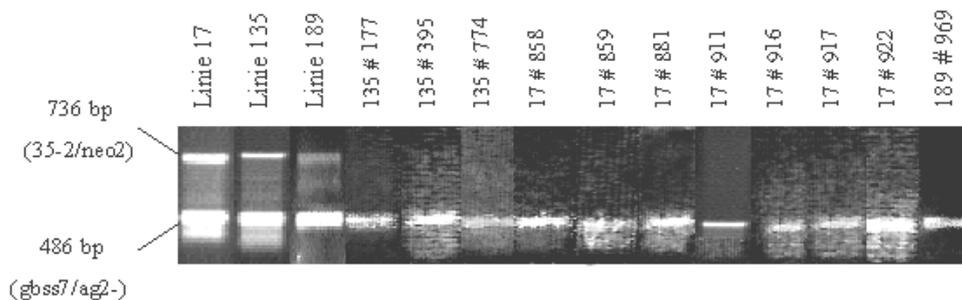
Die Zahlen in der Tabelle zeigen die Pflanzennummer der Regenerate nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase ( $\gamma\delta$ ) oder  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q ( $\gamma\delta$ YQ) der *res*-markergenhaltigen Linien #17, #23, #97, #135 und #189.

### 3.9. Molekularbiologische Analyse von Regeneraten nach Behandlung mit $\gamma\delta$ Resolvase

#### 3.9.1. PCR Analyse

In einem weiteren unabhängigen Experiment, wurden 469 Pflanzen aus Regenerationsansätzen der transgene Linien nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase bzw. mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q in PCR Ansätzen untersucht.

469 DNA-Isolate der Pflanzen wurde mit folgenden spezifischen Primer untersucht (Tab. 17 und 18; im Anhang): *nptII*-Primer 35-2 und neo2 umgeben ein 736 bp Fragment des markerhaltigen Transgens. *GBSS*-spezifische Primer *gbss7* und *ag2-* erzeugen ein 486 bp Fragment des anti-sense *GBSS*-Locus. In 455 durchgeführten Ansätzen wurde Markergen-spezifische (736 bp) und anti-sense *GBSS*-spezifische (486 bp) Amplikons erzeugt (Abb. 19). Bei 14 Pflanzen konnte keine Markergen-spezifische Fragment nachgewiesen werden (die Pflanzennummer sind in der Tabelle 17 und 18 unterstrichen (im Anhang), während in der Kontrollreaktion mit *gbss7/ag2-* ein 486 bp Amplikon erzeugt wurde. Diese PCR Ansätze wurden nicht mit den Pflanzen #91, #1613 und #1950 durchgeführt, da diese bereits vorhergehenden Southern blot-Hybridisierungen als markerfrei identifiziert wurden (3.9.2.).



**Abb. 19 : PCR Analyse mit dem 35-2/neo2 und *gbss7/ag2-* Primern.**

Regeneraten der Linien: #17, #135 und #189 nach der Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase (# 177, #395 und #774) und  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q (#858, #859, #881, #911, #916, #917, #922 und #969).

Die Primerkombination 35-2/neo2 amplifiziert ein 736 bp langes markergenspezifisches Fragments bei DNA der Ausgangslinien #17, #135 und #189 als Matrize. In alle Spuren ist ein 486 bp langes Fragment zu sehen, das durch *gbss7/ag2-* Primern das anti-sense *GBSS*-Locus erzeugt wird.

Für einen weiteren Nachweis, der Markergenfreiheit wurden PCR Untersuchungen mit den Primern *ag1+* und *gbss8* durchgeführt. Diese PCR-Analyse ermöglicht die Identifizierung von markerfreien Transgenen bei gleichzeitiger Anwesenheit nicht rekombinierter T-DNA. Bei sequenzspezifischer Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase werden 1485 bp der Resistenzkassette entfernt. Enthält eine transgene Pflanze markerfreie T-DNA Abschnitte,

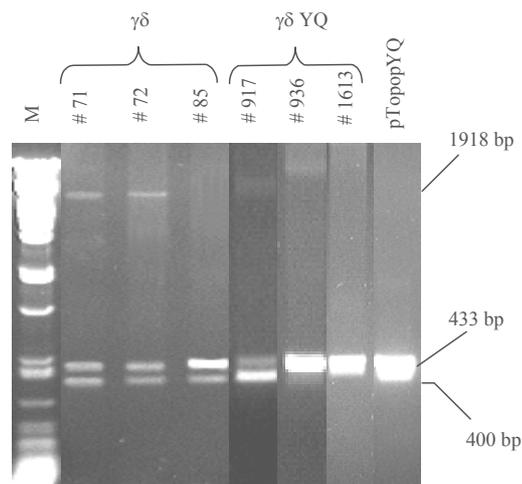
ergibt sich ein 433 bp großes *res*-markerfreies Amplikon. Nichtrekombinierte T-DNA führt zur Amplifikation eines 1938 bp großes Fragments. Abb. 20 zeigt beispielhaft eine PCR Untersuchung von DNA Isolaten aus Regeneraten der Linien #17 und #97 nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase bzw.  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q.

Mit der Primerkombination *ag1+* und *gbss8* wurden die oben erwähnten 469 Pflanzen und noch die Linien #91, #969, #1613 und #1950 untersucht. Es wurde 19 Pflanzenregenerate identifiziert, die ein vermutlich rekombinierte, markerfreie T-DNA enthielten (Tab. 19).

**Tab. 19: In PCR mit den Primern *ag1+*/*gbss8* identifizierte Pflanzen, die vermutlich rekombinierte T-DNA tragen.**

Linien	#17	#23	#97	#135
$\gamma\delta$	936; 946	654; 656	71; 72; 85; 356	151; 152
$\gamma\delta$ YQ	915; 916; 917; 921; 924		502; 510; 1613	

Zahlen zeigen die Nummer der jeweilige Regenerate nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase ( $\gamma\delta$ ) oder  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q ( $\gamma\delta$ YQ) der Ausgangslinien #17, #23, #97 und #135.

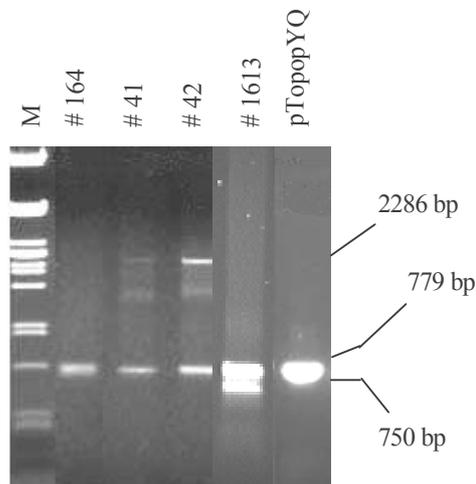


**Abb. 20 : PCR Analyse mit dem *gbss8* und *ag1+* Primer zur Nachweis der Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase bei den Regeneraten der Linie #97 (#71, #72, #85 und #1613) und der Linie #17 (#917 und #936) nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase oder  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q (#917, #936 und #1613).**

Diese Primerkombination amplifizieren ein 433 bp langes *res*-markerfreies Fragment bei pTopopYQ (Kontrollreaktion) und bei Regeneraten #71, #72, #85, #917, #936 und #1613 als Matrize.

Bei der Regeneraten #71, #72, #917 und #936 wurde ein 1938 bp großes Fragment, das der Kanamycinkassette entspricht, bekommen. Die Identität der ca. 400 bp großen Fragmente in der Ansätzen die Regenerate #71, #72, #85, #917 und in der Kontrollreaktion pTopoYQ als Matrize ist nicht geklärt.

Es wurden weitere PCR Ansätze mit den Primern *ag1+* und *ag2-* durchgeführt. Es wurde neben den bereits identifizierten Pflanzen mit markerfreie T-DNA bzw. die Pflanzen, die Nummer in Abb. 19 und Tab. 19 dargestellt sind und noch weitere 74 Regeneraten getestet (Tab. 17 und 18, kursiv gezeigt; im Anhang). Enthalten solche Pflanzen eine markerfreie T-DNA, sollte ein 779 bp großes Amplikon nachweisbar sein (Abb. 21).



**Abb. 21 : PCR Ansätze mit Primer *ag1+/ag2-* zur Amplifikation des markerfreien Fragments bei den Regeneraten der Linien #135 und #97 nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase (#164, #41, #42) und mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q (#1613).**

Bei der Regeneraten #164, #41, #42 und #1613 wurden ein 779 bp langes *ag+*/*ag2-*-markerfreies Fragment nachgewiesen. Bei pTopopYQ als Matrize amplifizieren diese Primer ein 779 bp langes *res*-markerfreies Fragments. Bei den Regeneraten #41 und #42 ist ein 2286 bp großes Fragment zu sehen, das der Kanamycinkassette entspricht. Ein etwa 750 bp unspezifisches Fragment ist bei PCR Produkten des Regenerats #1613 zu erkennen.

Mit den *ag1+/ag2-* Primern wurde 20 Pflanzen mit rekombinierter T-DNA identifiziert. Diese stammen von den Ausgangslinien #97 und #135. Die Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 20 dargestellt. Die Analyse von Pflanzenregeneraten der Ausgangslinien #23 und #189 ergab mit *ag1+/ag2-* in PCR Analysen mit genomischer DNA keine markerfreien Fragmente.

**Tab. 20: In PCR mit den Primern *ag1+/ag2-* identifizierte vermutlich rekombinierte Pflanzen.**

Linien	#97	#135
$\gamma\delta$	28; 52; 64; 66; 90; 91; 92; 98	41; 42; 43; 44; 131; 163; 164
$\gamma\delta$ YQ	101; 103; 104; 122; 124; 1613	

Zahlen zeigen die Nummer der jeweilige Pflanzennummer der Regenerate nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase ( $\gamma\delta$ ) oder  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q ( $\gamma\delta$ YQ) der *res*-markergenhaltigen Linien #97 und #135.

### 3.9.2. Southern blot-Analyse

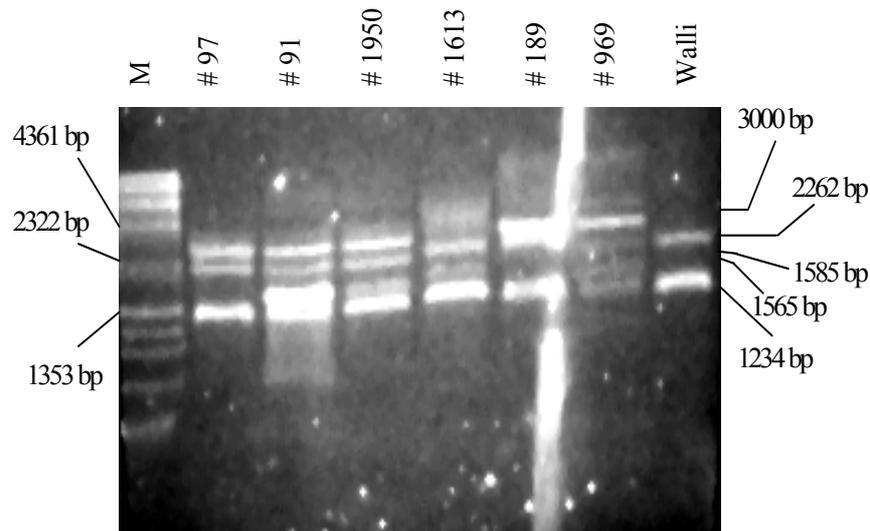
Um die PCR Ergebnisse zu bestätigen, wurden Southern blot-Analysen durchgeführt. Es wurden 211 Pflanzen nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase untersucht (Tab. 21; im Anhang). Bevorzugt wurden Pflanzen mit reduzierter Blattbildung nach Wachstum auf Kanamycin (3.8.) oder mit laut PCR Analysen rekombinierter T-DNA untersucht (3.9.1.). Neben diesen Pflanzen wurden in Southern blot-Experimente weitere 24 Regeneraten aus der Linien #57, #93 und #253 nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase analysiert.

Aus Blättern der pGRKR3-6 Transgenlinien wurde nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase genomische DNA isoliert, mit *HinDIII* geschnitten und mit einer 1528 bp großen Sonde hybridisiert. Diese Probe erkennt das markerfreie Fragment. In der Ausgangssorte Walli hybridisiert die Sonde an den *GBSS*-Locus und es ergeben sich Banden von jeweils 2262 bp und 1234 bp. In den Ausgangslinien #97 (pGRKR6) und #189 (pGRKR5) kann die markerhaltige T-DNA mit *GBSS*-Sequenzen als ein 3,0 kb Fragment nachgewiesen werden. Falls sequenzspezifische Rekombination stattgefunden haben sollte, bildet sich ein kleines *HinDIII* Fragment bei T-DNA aus pGRKR3 und pGRKR4 (1565 bp) und bei T-DNA aus pGRKR5 und pGRKR6 (1585 bp). Die Anwesenheit solcher Fragmente beweist die sequenzspezifische Rekombination der eingeführten T-DNA durch  $\gamma\delta$  Resolvase.

In der Southern blot-Analyse wurden 4 Pflanzen identifiziert, die ein etwa 1,6 kb *HinDIII* Fragment nach erfolgreicher Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase oder  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q aufweisen (Abb. 22). Die Pflanzen #1613 und #1950 sind Regenerate der Linie #97 (mit T-DNA aus pGRKR6) nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q. Die Pflanze #91 ist ein Regenerat der Linie #97 nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase. Das Regenerat #969 stammt aus der Linie #189 (mit T-DNA aus pGRKR5) nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q. #91, #969 und #1950 enthalten nicht rekombinierte T-DNA (3,0 kb *HinDIII* Fragment aus T-DNA der Plasmide pGRKR5 und pGRKR6). Eine Übersicht der Southern blot-Experimente ist in der Tabelle 21 gezeigt (im Anhang).

Die Pflanze #1613 enthält neben den genomischen *HinDIII* Fragmenten des *GBSS*-Locus nur noch ein 1585 bp *HinDIII* Fragment, das markerfreier T-DNA entspricht. Die ursprüngliche T-DNA (3,0 kb) ist nicht nachweisbar.

#1613 könnte die erste markerfreie transgene Pflanze sein, die durch Nutzung des  $\gamma\delta$  Resolvase/*res* Systems hergestellt wurde.



**Abb. 22 : Southern blot-Analyse der markerhaltigen Linien #97, #189, der Ausgangsorte Walli und der Regeneraten #91, #969, #1613, #1950 nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase oder  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q.**

Die DNA wurde mit *Hin*DIII behandelt und mit einer 1528 bp große Sonde hybridisiert. Bei der Ausgangsorte Walli hybridisiert diese Sonde an den *GBSS*-Locus (2262 bp und 1234 bp). Zusätzlich ist ein etwa 3,0 kb T-DNA Fragment bei der Linien #97 und #189 nachweisbar.

Die Pflanzen #91 (ein Regenerat aus der Linie #97 nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase), #1950 (ist ein Regenerat aus der Linie #97 nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q) und #969 (ist ein Regenerat aus der Linie #189 nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q) enthalten das markerfreie *Hin*DIII Fragment (1585 bp), aber es ist auch die ursprüngliche 3,0 kb T-DNA zu sehen. Die Pflanze #1613 ist ein Regenerate der Linie #97 nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q. #1613 enthält kein markerhaltiges 3,0 kb Fragment.

## 4. Diskussion

### 4.1. Synthese des modifizierten $\gamma\delta$ Resolvase Gens

Die Gensequenzen zum Aufbau des  $\gamma\delta$  Resolvase/*res*-Systems wurden vollständig *in vitro* erzeugt. Oligonukleotide auf Basis einer optimalen Kodonnutzung der Kartoffel fungierten dabei in PCR-Ansätzen zugleich als Matrize und Startmoleküle. Die einzelsträngigen Primer überlappen jeweils am 3'-Ende mit 20 bp (3.1.1.-3.1.2.). Sie führten mit Taq-DNA Polymerase unter den gewählten konventionellen Bedingungen zu einer robusten Synthese von Fragmenten bis zu einer Länge von 130 bp. Bemerkenswert ist, dass bei der nachfolgenden Sequenzanalyse von jeweils drei Klonen kein fehlerhafter Einbau von Nukleotiden beobachtet wurde. Ein weiteres Merkmal dieses Verfahrens ist die einfache Reinigung der synthetischen Genfragmente aus Agarosegelen auf der Basis von molekularbiologischen Standardverfahren.

Die PCR-gestützte Gensynthese erlaubte die gezielte Modifikation der  $\gamma\delta$  Resolvase. Es wurde eine Optimierung des offenen Leserahmens in Anlehnung an die Kodonnutzung in *Solanum tuberosum* für die Expression in Kartoffel ohne Veränderung der resultierenden Aminosäuresequenz erreicht. So konnten auch die notwendigen Schnittstellen für einen kassettenartigen Aufbau des synthetischen  $\gamma\delta$  Resolvase Gens eingeführt werden. Der Austausch von kurzen Restriktionsfragmenten erlaubte den schrittweisen Aufbau von Varianten der  $\gamma\delta$  Resolvase. Um gezielt Gensequenzen zu modifizieren, welche die an den Aminosäurepositionen E102, M103 und E124 betreffenden Kodons tragen, mussten die entsprechenden  $\gamma\delta$  Resolvase Subfragmente (z.B. *gd-56*) nur ausgetauscht werden. Diese Arbeit liefert die Grundlage für weitere gezielte Änderungen im  $\gamma\delta$  Resolvase Gen.

Das Gensyntheseverfahren dieser Arbeit stellte eine Alternative zu bereits beschriebenen Methoden dar. De Rocher et al., 1998 beschreiben eine Gensynthese, die auf eine Matrize verzichtet. Es wurde ein *cryIA*-Gen mit erhöhtem GC-Gehalt für die effiziente Expression in Pflanzen völlig neu synthetisiert. Dabei wurde der Leserahmen in vier Segmenten eingeteilt, die von bis zu acht Oligonukleotiden abgedeckt wurden. Deren Überlappung betrug 25 bp (Dillon & Craig, 1990). In einer zweistufigen PCR wurde der gesamte Sequenzbereich hergestellt. Die Fehler innerhalb der synthetisierten Sequenzen mussten anschließend durch *in vitro* Mutagenese mit Pfu-Polymerase korrigiert werden (Kunkel et al., 1987). Diese Gensynthese PCR Methode wurde auf Grund ihrer Störanfälligkeit bei erhöhtem GC-Gehalt nicht zur Herstellung der  $\gamma\delta$  Resolvase angewendet. Da auch eine weitere Gensynthesetechnologie (TDL-PCR; Strizhov et al., 1996) nicht zur Erzeugung beliebiger DNA ohne Vorlage geeignet war, kam das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren zum Einsatz.

## 4.2. Transiente Transfektion der $\gamma\delta$ Resolvase in Kartoffelprotoplasten

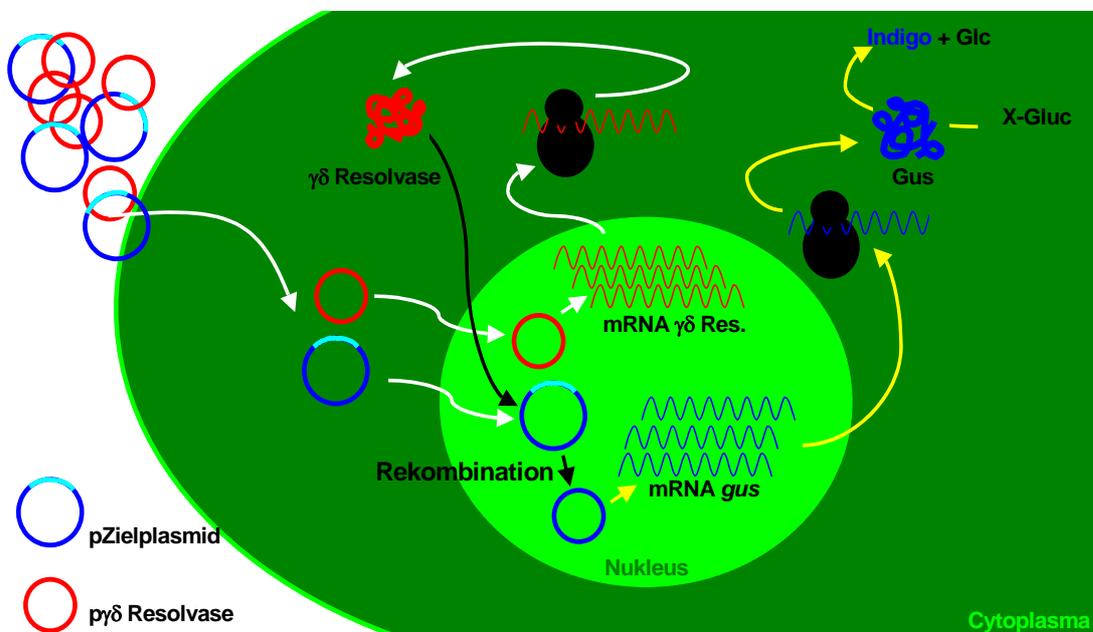
Es konnte die sequenzspezifische Rekombination in Kartoffelprotoplasten mit  $\gamma\delta$  Resolvase bzw.  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q gezeigt werden (3.6.). Für die Untersuchung wurden in Kartoffelprotoplasten ein Expressionsplasmid der  $\gamma\delta$  Resolvase und jeweils ein Zielplasmid mit *res*-Sequenzen transient übertragen. In Abbildung 23 ist ein Modell der Abläufe zur sequenzspezifischen Rekombination von *res*-Substraten in Kartoffel-Protoplasten mit  $\gamma\delta$  Resolvase dargestellt.

Expressionsplasmide (orange Kreise) und Zielplasmide (blaue Kreise) werden nach Behandlung der Zellen mit PEG in den Zellkern der Protoplasten (hellgrün) aufgenommen. Im Zellkern wird das  $\gamma\delta$  Resolvase Gen ( $\gamma\delta$  mRNA; orange Wellen) transkribiert und in das Zytoplasma (dunkelgrün) exportiert. Dort wird die  $\gamma\delta$  mRNA zu  $\gamma\delta$  Resolvase translatiert. Da entsprechende Signalsequenzen für einen Kernimport fehlen, gelangt  $\gamma\delta$  Resolvase vermutlich durch Diffusion des kleinen Proteins in den Zellkern. Auf dem Weg dorthin oder erst im Zellkern trifft  $\gamma\delta$  Resolvase auf die eingeführten DNA-Substrate (Zielplasmide). Es kann dann sequenzspezifische Rekombination erfolgen, die zur Transkription des *gus*-Reportergens führt. Im Zellkern wird *gus* mRNA (blaue Wellen) transkribiert und in das Zytoplasma exportiert. Dort kommt es zur Translation des Gus Proteins. Daher erscheinen die Protoplasten, die rekombinierte Zielplasmide tragen, nach Färbung mit dem farblosen X-Gluc Substrat blau (das Gus Protein setzt das Substratanalogon X-Gluc zu einem unlöslichen, blauen Indigo-Farbstoff um).

Dass die  $\gamma\delta$  Resolvase genomisch lokalisierte T-DNA mit *res*-Markergensequenzen (z.B. pGRKR3) als Substrat für sequenzspezifische Rekombination nutzen kann, wurde in Kapitel 3.6.2. gezeigt. Wenn der bekannte Rekombinationsmechanismus auf Substrate (Yang & Steiz, 1995), die in einem eukaryotischen Zellkern in chromosomaler Umgebung liegen, übertragen werden kann, wäre es möglich, dass die  $\gamma\delta$  Resolvase den entsprechenden Chromatinbereich in eine Rotationsbewegung versetzen kann. Erstaunlich dabei ist, dass bereits die kurze 28 bp *res*-Erkennungsstelle ausreichend ist und offenbar auf die Ausbildung des Resolvosoms mit 12 gebundenen  $\gamma\delta$  Resolvase Molekülen verzichtet werden kann.

Die durch  $\gamma\delta$  Resolvase vermittelte sequenzspezifische Rekombination von genomisch lokalisierten Markergensequenzen im transienten Protoplastensystem bietet viele Vorteile. Das zirkuläre Plasmid p $\gamma\delta$  erreicht bei der gewählten Transfektionsmethode mit PEG eine Vielzahl von Zellen und wird dabei vermutlich nicht ins Genom integriert. Der Einbau zirkulärer DNA-Moleküle ist im Einzelfall möglich, wie Untersuchungen mit *Penicillium citrinum* zeigen (Nara et al, 1993). Für Kartoffel gibt es bislang allerdings keine Hinweise. Ewa 10 % der eingesetzten Protoplasten können Plasmid DNA aufnehmen und die kodierten

Proteinen funktionell darstellen (M. Reichmann, pers. Mitteilung). Prinzipiell wird durch die transiente Expression der  $\gamma\delta$  Resolvase die Markergenentfernung in Einzelzellen ermöglicht. Unkontrollierbare Nebeneffekte durch konstitutive Expression und weitere Integration von zusätzlichen Transgensequenzen können mit großer Sicherheit vermieden werden. Der große Nutzen liegt in der hohen Biosicherheit des verwendeten transienten Systems. Andere z.B. virale Expressionssysteme für Pflanzen müssen nicht eingesetzt werden (Escobar et al., 2003). Offenbar ist es auch nicht notwendig, in das Expressionsplasmid der  $\gamma\delta$  Resolvase mehrere Introns für eine verbesserte Expressionsleistung in den Kartoffelzellen einzuführen, um in Pflanzen möglichst viel Fremdprotein herstellen zu können (Marillonnet et al., 2005). Vermutlich ist eine limitierte Aktivität ausreichend, da Rekombination mit  $\gamma\delta$  Resolvase schnell und effizient ist (Sherratt, 1989). Aufwendige Genkonstruktionsarbeiten können daher vermieden werden.



**Abb. 23 : Model der sequenzspezifischen Rekombination in Kartoffelprotoplasten durch  $\gamma\delta$  Resolvase.**

Das Zytoplasma der Kartoffelprotoplasten ist mit dunkelgrüner Farbe symbolisiert, der Zellkern ist mit hellgrüner Farbe dargestellt. Das Expressionsplasmid des  $\gamma\delta$  Resolvase/*res* Systems ( $\gamma\delta$  Resolvase) ist mit einem orangen Kreis, die Zielplasmide z.B. *prxr4gus* mit blauen Kreisen dargestellt. Hellblaue Abschnitte symbolisieren *res*-flankierte DNA-Sequenzen. Das rekombinierte Zielplasmid ist mit einem blauen Kreis dargestellt.  $\gamma\delta$  Resolvase mRNA ist mit orangen Wellen und *gus* mRNA mit blauen Wellen hervorgehoben. Aus der  $\gamma\delta$  Resolvase mRNA wird an den Ribosomen (schwarze Bälle)  $\gamma\delta$  Resolvase und aus *gus* mRNA Gus Protein translatiert. Die Aktivität des Gus Proteins kann in einer Färbereaktion mit dem des farblosen Substrat X-Gluc nachgewiesen werden. Gus führt zu Bildung eines blauen Indigofarbstoffes und zeigt indirekt sequenzspezifische Rekombination der Zielplasmide durch  $\gamma\delta$  Resolvase an.

Die Regeneration von Kartoffelpflanzen aus Protoplasten ist sogar in einem Routinebetrieb möglich. Da die Regeneration aus einer Zelle erfolgt, werden bei diesem Verfahren vermutlich keine chimären Pflanzen erzeugt. Regenerierte Kartoffelpflanzen sind daher markerfrei, wenn die sequenzspezifische Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase stattgefunden hat oder markerhaltig (wenn keine sequenzspezifische Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase durchgeführt wurde).

### 4.3. Die *gus*-Reportergergenkonstrukte mit *res*-Zielsequenzen

Es wurden in Kartoffelprotoplasten vier *gus*-Reportergergenkonstrukte mit *res*-Zielsequenzen charakterisiert. Untersuchungen mit Zielplasmiden, die am 5' Bereich des *gus*-Reportergergens eine 114 bp *res*-Sequenzen enthalten (prxR2gus1, pRxR3gus), brachten zu Tage, dass die 2,1 kb lange DNA-Sequenz zwischen den beiden *res*-Sites auf die Aktivität des *gus*-Reportergergens keinen Einfluss hatte (3.3.; Tab. 6 und 7; im Anhang). Die Gus-Aktivität der Zielplasmide pRxR3gus und prxR2gus1 könnte mit einer promotorenähnliche Funktion der unmittelbar 5' vor *gus* liegenden 114 bp *res*-Sequenzen erklärt werden. Diese Eigenschaft von *res* wurde bereits für die Kontrolle der Transkription von *tnpA* und *tnpR* festgestellt (Reed et al., 1982; Wells & Grindley, 1984). Bemerkenswert ist, dass die Regulation der Transkription von *res*-ähnlichen Sequenzen demnach auch zu einer Aktivierung benachbarter Gene in Pflanzen führen könnte.

Die Transkriptionsaktivität des *gus*-Reportergergens aus prxR2gus1 wurde in allen durchgeführten experimentellen Ansätzen mit  $\gamma\delta$  Resolvase Varianten unterdrückt- mit der Ausnahme der  $\gamma\delta$  Resolvase E102Y in Kombination mit prxR2gus1 in Sorte Jumbo (Tab. 7; im Anhang; einmalige Reaktion). Es ist daher möglich, dass hier eine durch  $\gamma\delta$  Resolvase vermittelte sortenabhängige Rekombinationsreaktion beobachtet wurde. Ein Präparationsartefakt ist jedoch nicht auszuschließen. In „schlechten“ Protoplastenpräparationen liegen z.T. tote Zellen und Zellreste vor, die möglicherweise DNA Nukleasen enthalten, welche im Reaktionsansatz freigesetzt werden und zu einer Degradation des  $\gamma\delta$  Resolvase Expressionsplasmids führen können. Eine mögliche Sortenabhängigkeit wurde auch bei den Experimenten mit pRxR3gus als Zielplasmid in Kombination mit  $\gamma\delta$  Resolvase Varianten beobachtet (Tab. 6; im Anhang). Möglicherweise erfüllt aber in bestimmten Fällen die  $\gamma\delta$  Resolvase unabhängig von ihrer Resolvaseaktivität auch eine Funktion als Repressor von aktiv transkribierten Genen (Newman & Grindley, 1984).

Die unterschiedlichen Ergebnisse mit *prxR2gus1* (Tab. 7; im Anhang) und mit *pRxR3gus* (Tab. 6; im Anhang), die nahezu vollständige Inhibierung der *Gus*-Aktivität durch  $\gamma\delta$  Resolvase bzw. nur in 60 % der Fälle eine Hemmung zeigten, könnten damit erklärt werden, dass *pRxR3gus* (3.1.6.) zwei volle *res* Sites (jeweils 114 bp *res*-Sequenz) und *prxR2gus1* (3.1.6.) eine *res* Site I (28 bp *res*-Sequenz) und eine volle (114 bp *res*-Sequenz) *res* Sites enthält. An allen Bindungsstellen der beiden vollen *res* Sites (*pRxR3gus*) könnte  $\gamma\delta$  Resolvase binden und ein Synaptosom bilden. An das Zielplasmid *prxR2gus1* binden vermutlich 4 Moleküle der  $\gamma\delta$  Resolvase pro 28 bp *res* Site I weniger. Die Stabilität des Proteinkomplexes könnte sich im Vergleich zu einem vollständigen Synaptosom unterscheiden. Allein die Bindung der  $\gamma\delta$  Resolvase, auch wenn es sich dabei um nicht rekombinationskompetente Varianten handelte, könnte für die Hemmung der *gus* Expression verantwortlich sein, dadurch, dass die Initiation, d.h. die Bindung der RNA-Polymerase Komplexes behindert wird. Es ist noch nicht abschließend geklärt, wieso bei Einsatz von  $\gamma\delta$  Resolvase die Aktivität des *gus*-Reportergens im unterschiedlichen Ausmaß unterdrückt wird.

In Säugerzellen wurde gezeigt, dass die  $\gamma\delta$  Resolvase eine 114 bp lange oder 32 bp lange *res*-Sequenz (Site I) rekombiniert (Schwikardi & Dröge et al., 2000, 2001). Im Vergleich zu Säugerzellen konnte in Kartoffelprotoplasten gezeigt werden, dass  $\gamma\delta$  Resolvase und  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q sogar noch kürzere *res*-Sequenzen (28 bp) für eine erfolgreiche Rekombination nutzen können (Tab. 5; im Anhang).

Im Gegensatz zu den *prxr4gus* Substraten unterschied sich die Rekombinationsaktivität von *pRxr1gus* mit  $\gamma\delta$  Resolvase und  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q. Das *res* Konstrukt aus *pRxr1gus* (114 bp und 28 bp) mit  $\gamma\delta$  Resolvase resultierte in ungefähr 10-mal mehr Rekombinationsprodukten als *prxr4gus*, aber die Aktivität des *gus*-Reportergens war 10-mal geringer in den Ansätzen *pRxr1gus* mit  $\gamma\delta$  Resolvase als *prxr4gus* mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q. Dieser Unterschied könnte auf Grund der mehrfachen Wiederholung der jeweiligen Versuchsansätze kaum durch eine „schlechte“ Protoplastenpräparation erklärt werden. Es könnte vielmehr die 114 bp *res*-Sequenz im *pRxr1gus* Zielplasmid dafür verantwortlich sein. An *pRxr1gus* könnten theoretisch 4 Moleküle mehr  $\gamma\delta$  Resolvase als an *prxr4gus* binden. Die Ausbildung eines möglicherweise voll funktionsfähigen Resolvosoms an 114 bp *res* könnte die Effektivität des sich ausbildenden Synaptosoms aus 8  $\gamma\delta$  Resolvase Untereinheiten verbessern und die höhere Aktivität des *gus*-Reportergens vermitteln. Die Stabilität der Synaptosoms beeinflusst vermutlich auch die Expression des Reporter gens in Ansätzen *prxr4gus* mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q. Eine Sortenabhängigkeit wurde auch hier in den Ansätzen mit  $\gamma\delta$  Resolvase mit *pRxr1gus* in Sorte Rita bzw. Patrona beobachtet (3.3.; Tab. 4 und 5; im Anhang). Interessanterweise kann  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q auch in Säugerzellen Rekombination durchführen, wenn nur die *res* Site I vorliegt (Dröge, 2001).

#### 4.4. Die durch $\gamma\delta$ Resolvase vermittelte sequenzspezifische Rekombination auf Plasmiden und im Genom von Kartoffeln

Eine wichtige Voraussetzung für die effiziente Rekombination durch die  $\gamma\delta$  Resolvase in *E.coli* und *in vitro* ist das Supercoiling des DNA-Substrats (Schwikardi & Dröge et al., 2000). Genomische DNA in höheren Eukaryoten befindet sich jedoch in einem topologisch relaxierten Zustand, d.h. es liegen keine freien superhelikalen Windungen in der DNA vor, die z.B. die  $\gamma\delta$  Resolvase für die Rekombinationsreaktion nutzen könnte. Daher wurde die  $\gamma\delta$  Resolvase bis jetzt nicht zu Rekombination in eukaryotischen Zellen verwendet (Dröge, 2001).

Die  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q kann unabhängig vom topologischen Zustand der DNA die Rekombinationsreaktion zwischen zwei *res*-Sequenzen katalysieren (Dröge, 2001). Offenbar spielen die veränderten Dimerisierungseigenschaften der mutierten Resolvase monomere hierbei eine wichtige Rolle (Arnold et al., 1999). Bei den durchgeführten Untersuchungen war die  $\gamma\delta$  Resolvase ( $\gamma\delta$  WT) auf Grund der Beschreibung in der wissenschaftlichen Literatur als Negativ-Kontrolle vorgesehen. Überraschenderweise hat sich ergeben, dass das  $\gamma\delta$  Resolvase ( $\gamma\delta$  WT) in Pflanzen die hergestellten Rekombinationssubstrate umsetzen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden 9 verschiedene Varianten der  $\gamma\delta$  Resolvase auf Kartoffelprotoplasten übertragen. Im Vergleich zu Schwikardi & Dröge et al. (2000) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase auf Zielplasmiden mit *gus*-Reportergen und im Genom von Kartoffelzellen rekombinationsfähig ist. Eine Rekombination durch Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase in Säugerzellen wurde auf Episom- und Genomsubstraten nicht nachgewiesen (Schwikardi & Dröge et al., 2000, 2001).

Es kann mehrere Gründe geben, warum die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase die Rekombinationsreaktion in Pflanzenzellen katalysiert und in Säugerzellen nicht: 1) Der offene Leserahmen der in dieser Arbeit hergestellten  $\gamma\delta$  Resolvase wurde für eine Expression in Kartoffel in Anlehnung an die Kodonnutzung in *Solanum tuberosum* optimiert. 2) Es liegen hier prinzipiell andere regulatorische Elemente vor. Möglich ist, dass es zu einer unterschiedlichen Expression der  $\gamma\delta$  Resolvase kommt, vielleicht durch eine bessere Transkription oder durch erhöhte RNA Stabilität oder beides. 3) Das synthetische  $\gamma\delta$  Resolvase-Gen enthält an Position E102 an Stelle von Glutamin (E-Kodon) Glutamat (D-Kodon). Es ist unwahrscheinlich, dass die Reduktion des Säurenrests um 1  $\text{CH}_2$ -Gruppe zur Aktivität führen kann. 4) Möglicherweise liegen in Pflanzen „günstige“ Cofaktoren vor, welche die Aktivität der Resolvase unterstützen. Allerdings liegen dazu keine experimentelle Ergebnisse vor. 5) Außerdem wurde das Expressionsplasmid der  $\gamma\delta$  Resolvase in Kombination mit DNA-Substrat in Kartoffelprotoplasten (diese Arbeit) durch PEG und in Säugerzellen (Schwikardi & Dröge et al., 2000, 2001) über Lipofektion (Episomsubstrat) oder

Elektroporation (Genoms substrat) übertragen. Möglicherweise bestimmt der Mechanismus der DNA-Aufnahme auch die Aktivität der übertragenen zirkulären Genkonstrukte, die bei unterschiedlichen Transfermethoden eine veränderte Topologie aufweisen könnten.

Die mit T-DNA Plasmiden (pGRKR3 und pGRKR5 mit *res*-Markergenkassette) durchgeführten Untersuchungen im transienten Kartoffelprotoplasten System zeigten, dass die  $\gamma\delta$  Resolvase und  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q die *res* Site I (jeweils 28 bp lang) als Substrat nutzen können (3.6.1.; Abb. 15). Diese konnte aber nicht beim Einsatz einer T-DNA aus pGRKR4 beobachtet werden. Aus pGRKR6 konnte nur die  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q *res*-Sequenzen als Substrat für die sequenzspezifische Rekombination verwenden. Es könnten die Anordnung der funktionellen Elemente in den jeweiligen Substratplasmiden, aber auch Variationen beim Transfer in Protoplasten dafür verantwortlich sein. Die Signifikanz der Ergebnisse mit pGRKR4 und pGRKR6 sollte noch intensiver überprüft werden.

In Säugerzellen wurde gezeigt, dass auf episomalen Substraten mit zwei vollen *res* Sites (114 bp lange), bzw. *res* Site I (jeweils 32 bp Länge) die mutante  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q rekombinieren kann (Schwikardi & Dröge, 2001). Außerdem wurde in CHO-Zellen Rekombination mit  $\gamma\delta$  Resolvase E124Q nachgewiesen. Dazu waren zwei volle *res* Sites erforderlich (Schwikardi & Dröge, 2001).  $\gamma\delta$  Resolvase E124Q in Kartoffelprotoplasten (diese Arbeit) führte mit den in dieser Arbeit hergestellten Substraten allerdings nicht zu entsprechenden Ergebnissen.

Es wurde die Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase und  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q im transgenen Kartoffellinien mit T-DNA aus pGRKR3, pGRKR5 und pGRKR6 untersucht (3.6.2.; Abb. 16). Es wurde gezeigt, dass die  $\gamma\delta$  Resolvase und  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q *res* Site I flankierte Bereiche aus einer in das Genom von Kartoffelpflanzen stabil integrierten T-DNA entfernen kann. Das wurde bei 5 unabhängigen, transgenen Linien nachgewiesen: #23, #97, #135, #155 und #189. Die  $\gamma\delta$  Resolvase bzw.  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q rekombinieren im Genom der Kartoffel wahrscheinlich auf Grund zufälliger Kollision von *res* Site I Bereichen (Schwikardi & Dröge, 2001). In CHO-Zellen wurde eine Rekombinationsreaktion im Genom durch  $\gamma\delta$  Resolvase nicht nachgewiesen. Die  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q führte in 2 % der Zellen zu Rekombination. Genomische Substrate werden vermutlich weniger rekombiniert als ihre Episomgegenstücke. Die  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q scheint beeinträchtigt zu sein, wenn die Zielsequenzen in Chromatin eingepackt sind (Schwikardi & Dröge, 2001). Bei Nichtvorhandensein der Bindungsstellen II und III wurde durch  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q in CHO-Zellen 10 % der Zellen rekombiniert, außerdem wurde Inversion nachgewiesen (Schwikardi & Dröge, 2001). Es ist nicht klar, ob die  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q in Kartoffelprotoplasten auch die Inversion von *res* Site I katalysieren kann.

In der Praxis konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von  $\gamma\delta$  Resolvase und  $\gamma\delta$

Resolvase E102YE124Q transgenene Pflanzen mit rekombinierter T-DNA erzeugt werden konnte. Dies wurde an unterschiedlichen Regeneraten aus den Linien #97 (#91, #1613 und #1950) und #189 (#969) nachgewiesen. Wie in Abb. 22 zu sehen ist, wurde in allen, Linien 1585 bp *res*-markergenfreie T-DNA detektiert.

#### **4.5. Herstellung *res*-markerfreier Kartoffelpflanzen**

##### **4.5.1. Identifizierung *res*-markerfreie Kartoffelpflanzen**

Die Beschränkung der Fremd DNA-Sequenzen in transgenen Pflanzen ist nach der Richtlinie Europäischen Union 2001/18/EG ein wesentliches Anliegen der Gentechniküberwachungsbehörden, aber es ist auch aus wissenschaftlichen und praktischen Gründen von Bedeutung: überflüssige und häufig repetitive Sequenzen stellen eine unnötige Quelle für ungewollte Interaktionen (z.B. Gene silencing) dar und die Eliminierung der Markergene ermöglicht außerdem eine sekundäre Transformationen der Pflanzen. Die Herstellung markerfreier Pflanzen wird in der Regel wegen der ökologischen Risiken diskutiert (Gressel, 1992; Bryant & Leather, 1992), wegen der Vorbehalte von Konsumenten und aufgrund von praktischen Problemen bei Mehrfachtransformationen (Goldsbrough, 1992).

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Eliminierung der Markergene in Pflanzen untersucht. Dieser Ansatz beruht sich darauf, in einem ersten Schritt die mit Agrobakterien übertragene *res*-flankierte Markergenkassette (*nptII*-Gen als Selektionsmarker) durch die Rekombinase  $\gamma\delta$  Resolvase (Schwikardi & Dröge et al., 2000, 2001) zu entfernen und damit die markerfreien transgenen Pflanzen effektiv und schnell zu erzeugen.

Die Abbildung 24 zeigt schematisch die Erzeugung *res*-markerfreier Kartoffelpflanzen durch Nutzung des  $\gamma\delta$  Resolvase/*res* Systems. Die Protoplasten aus den transgenen Pflanzen wurden transient mit  $\gamma\delta$  Resolvase behandelt, die die *res* Sites erkennt, und an diese unter Bildung eines synaptischen Komplexes bindet. Durch sequenzspezifische Rekombination wird im Komplex Spaltung, Rotation und gleichzeitig Deletion stattfinden. Ergebnis dessen sind zwei Produkte mit jeweils einer *res* Sites: (1) eine *res* Sites mit Markergenkassette wird als zirkuläres Produkt entfernt und (2) im Genom bleiben das notwendige funktionelle Gen mit der zweiten *res*-Sequenz zurück. Es folgt die Regeneration der markerfreien Kartoffelpflanzen.

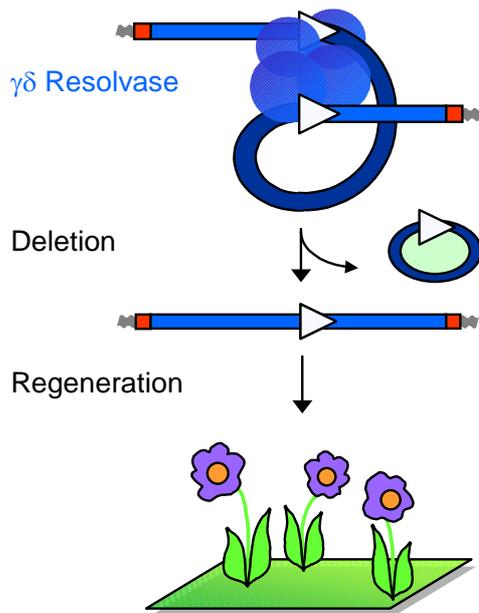


Abb. 24 : Schematische Übersicht zur Herstellung *res*-markerfreier transgene Kartoffelpflanzen.

#### *Test auf MS+Kanamycin Medium*

Das Vorhandensein von Kanamycin im Kulturmedium verlangsamt die Regeneration, bzw. hemmt das Wachstum der Pflanze (Horlemann et al., 2003). In dieser Arbeit durchgeführte Kanamycintests (3.8.) ergab, dass die Blattbildung von 10 % der untersuchten Pflanzen auf MS+Kanamycin Medium gestört wurde, darunter waren die Pflanzen: #71, #72, #152 und #1613, die später als markerfrei identifiziert wurden.

Das Kanamycintest ist eine einfache Methode aber hat den Nachteil, dass bei Pflanzen, die mehrere Kopien des Transgens nach der sequenzspezifische Rekombination möglicherweise nur teilweise markerfreie Transgenloci enthalten, wie z.B. #91 und #967 (3.9.2. Abb. 22), die Blattbildung der rekombinierten Pflanzen auf Kanamycin-haltigem Medium vermutlich nicht gestört wird.

Mit dem Kanamycintest wurden rekombinierte Pflanzen identifiziert, deren Blattbildung auf MS+Kanamycin Nährmedium gestört wurde (3.8.; Tab. 16). Die nachfolgenden Experimente (PCR und Southern blot) haben gezeigt, dass für die eindeutige Identifizierung markerfreier Pflanzen neben dem Kanamycintest zusätzliche Untersuchungen notwendig sind.

#### *PCR Untersuchung*

Parallel zum Kanamycintest wurden die transgenen Pflanzen mit T-DNA aus pGRKR3-6 nach Behandlung mit γδ Resolvase oder mit γδ Resolvase E102YE124Q in analytischen PCRs untersucht, um die markerfreien Pflanzen weiter zu charakterisieren (3.9.1.; Tab. 17 und 18; im Anhang).

In PCR Ansätzen mit 35-2/neo2 Primerkombination zeigten 3,6 % keine *nptII* spezifisches 736 bp Fragmente. Dagegen wurde in den Kontrollen ein 486 bp Fragment des *asGBSS*-Transgens erzeugt (Abb.19). Es könnte sich daher bei solchen Pflanzen um markerfreie Linien handeln. Diese wurde in einer weitere PCR mit *ag1+/gbss8* untersucht. Während in einer Vielzahl der PCR Ansätzen mit verschiedene Linien ein 1938 bp lange markerhaltiges Fragment erzeugt wurde, konnte mit DNA der Linien #71, #72, #85, #152, #967 und #1613 ein 433 bp (1938 bp – 1485 bp *res* Site I + *nptII* Kasette) langes Fragment nachgewiesen (Tab. 19; Abb. 20).

In weiteren Ansätzen mit *ag1+/ag2-* zeigten allerdings nur #91 und #1613 das markerfreie 779 bp Fragment (3.9.1.; Tab.20; Abb. 21). Bei #71, #72, #85 und #152 gelang Nachweis des markerhaltigen 1938 bp Fragments.

Zusammenfassend war es möglich in PCR Ansätzen markerfreie Linien zu identifizieren. Die PCR Untersuchungen liefern aber z.T. widersprüchliche Ergebnisse. Während bei #71, #72, #85 und #152 mit *gbss7/ag2-* und *ag1-/gbss8* die für markerfreie Linien typischen Fragmente nachgewiesen werden, schlug der spezifische Nachweis bei Primerkombination *ag1+/ag2-* fehl. Vielmehr werden markerhaltige Sequenzen erhalten. Dieses Phänomen kann auf Grund der bisherige Datenlage noch nicht erklärt werden.

Die PCR Ergebnisse führten zu einer weiteren Einengung von Pflanzenregeneraten aus Ansätzen mit  $\gamma\delta$  Resolvase, die möglicherweise keine Markergensequenzen mehr tragen. Auf Grund der z.T. entgegengesetzten Ergebnisse wurden ausgewählte Pflanzen in den nachfolgenden Southern blot-Analyse weiter untersucht.

#### *Southern blot-Analyse*

Die Southern blot-Analyse ist die zuverlässigste Methode zum Nachweis der rekombinierten T-DNA im Pflanzengenom. In diese Untersuchungen wurden 235 Pflanzen nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase einbezogen (3.9.2.; Tab. 21; im Anhang). Aus diesen Pflanzen wurden die Linien #91, #967 #1613 und #1950 mit markergen-freier T-DNA identifiziert (Abb. 22).

Aus den Transgenlinien wurde nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase die genomische DNA isoliert und mit *HinDIII* geschnitten. Diese Enzym schneidet T-DNA aus pGRKR3-6 am 5' Enden der *asGBSS*-Sequenz und pWx. Für die Southern blot-Analyse verwendete 1528 bp lange Sonde (2.3.4.) hybridisiert 5' Ende der *asGBSS*-Sequenzs und PWx. Deswegen wird in der Ausgangsorte Walli 2 Banden von jeweils 2262 bp und 1234 bp aus dem *GBSS*-Locus detektiert.

Die Pflanzen #91, #967, #1613 und #1950 haben in Southern blot-Analyse ein 1585 bp *HinDIII res*-markergenfreies T-DNA Fragment nach erfolgreicher Rekombination durch  $\gamma\delta$

Resolvase oder  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q (Abb. 22). Außerdem wurde in den Linien: #91, #967 und #1950 ein 3,0 kb Fragment nachgewiesen, welches die markerhaltige T-DNA mit *GBSS*-Sequenzen enthält und in den Ausgangslinien #97 und #189 detektiert wurde. Bei der Linie #1613 wurde keine ursprüngliche T-DNA hybridisiert. Dieses Ergebnis konnte mehrfach in 4 unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass aus dem Regenerat #1613 alle Kopien des Transgens eliminiert wurde.

Die andere Pflanzen z.B. #71, #72, #85 und #152, die laut PCR Ansätzen oder Kanamycintest als rekombiniert ausgewählt wurden, ergaben in der Southern blot-Analyse nicht das *res*-markerfreie T-DNA Fragment. Diese Ergebnisse konnte noch nicht erklärt werden, wären aber auf Grund der unterschiedlichen Sensitivität von PCR- und Southern blot-Analytik leicht erklärbar.

Die Vorteile von  $\gamma\delta$  Resolvase sind in Kapitel 1.5. und 4.4. beschrieben. Diese Systeme sind bis jetzt erfolgreich in Säugertierzellen verwendet worden (Schwikardi & Dröge, 2000; Schwikardi & Dröge, 2001). In vorliegende Arbeit wurde schon gezeigt, dass die  $\gamma\delta$  Resolvase und auch  $\gamma\delta$  Resolvase  $\gamma\delta$ E102YE124Q auf Plasmiden und im Genom von Kartoffel sequenzspezifisch rekombinieren. Im Gegensatz zu anderen Ansätzen mit Rekombinasen (Hare & Chua, 2002) wird die  $\gamma\delta$  Resolvase nicht in Kartoffelgenom integriert. Die  $\gamma\delta$  Resolvase für eine sequenzspezifische Rekombination braucht ein DNA-Substrat mit zwei *res*-Sequenzen, die in direkte Wiederholungen vorliegen. Es wird die intramolekulare Rekombination katalysiert. Daraus resultiert die Deletion eines DNA-Segments (Dröge, 2001). Daher bietet die Anwendung der  $\gamma\delta$  Resolvase, als Werkzeug für die Erzeugung markerfreier Pflanzen einen alternativen Weg gegenüber FLP oder Cre Rekombinasen (Gilbertson, 2003; Kilby et al., 1995).

Die Anwendung des  $\gamma\delta$  Resolvase/*res* Systems ist eine neue Entwicklung in der Pflanzengentechnik. Für eine vollständige Charakterisierung des Systems sind weitere Erfahrungen über die Auswirkungen dieser Rekombinase auf die Pflanzenzelle notwendig. Es sollte untersucht werden ob die  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q in Pflanzenzelle, wie in Säugetieren (Schwikardi & Dröge et al., 2000, 2001) die Inversionen katalysiert, oder zu einer unerwünschten Neuordnung im Genom führt, was für Cre, FLP oder Gin Rekombinasen bekannt ist (Gilbertson, 2003; Kilby et al., 1995; Maeser & Kahmann, 1991). Außerdem sollte man untersuchen, welche Auswirkung die transiente Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase und die nach der Markergeneliminierung im Genom verbliebene 28 bp lange *res*-Sequenz auf die so erzeugte markerfreie Pflanze hat.

Derzeit werden verschiedene andere Strategien zur Beschränkung der übertragenen Sequenzen auf das notwendige Maß und eine Trennung von Markergen und Zielgen im Genom der Pflanzen untersucht.

*Es stehen folgenden Methoden zur Verfügung:*

- Ersetzen von Antibiotika-Resistenzgenen zur Identifizierung von transgenen Pflanzen durch Herbizidresistenzen oder spezielle Stoffwechsellzyme. Es werden auch Farbmarker wie das *gfp*-Gen eingesetzt (Becker, 1994; Kunkel, 1999; Prasher et al., 1995).
- Co-Transformation (Komari et al., 1996; Lu et al., 2001). Bei dieser Transformation werden zwei Genkonstrukte separat übertragen, was dazu führt, dass Nutz- und Selektionsgen nicht gekoppelt vorliegen. Wurden beide Gene auf unterschiedlichen Chromosomen integriert, kann der Selektionsmarker durch Kreuzung und Segregation vom anderen Gen getrennt und auf diese Weise entfernt werden. Allerdings spalten bei dieser Methode auch andere wichtige Merkmale, so dass dieser Ansatz für die vegetativ vermehrte Kartoffel nur eingeschränkt verwendet werden kann.
- Transposon-vermittelte Eliminierung des Markergens im Genom durch Ac/Ds Transposition (Goldsbrough et al., 1993; Ebinuma et al., 1997). Das Ziel- oder Markergen wird bei der Konstruktion des Übertragungsvektors zwischen zwei Ds-Sequenzen positioniert. Später wird durch via Kreuzung oder Sekundärtransformation eine Ac-Transposase in die Pflanze gebracht. Die Transposase erkennt entsprechende Sequenzmotive und schneiden aus. Somit können markerfreie Pflanzen, die das eingeführte wichtige Gen enthalten, selektiert werden. Es kann aber zu einer Reintegration kommen. Transposon-vermittelte Eliminierung des Markergens weisen wie Co-Transformationsansätze Unwägbarkeit auf wie die Insertion auf unterschiedlichen Chromosomen und die zufällige Segregation bei der Kreuzung.
- Transfer von minimierten Genkonstrukten, die keine problematischen DNA-Sequenzen tragen (de Vetten et al., 2003). Grundvoraussetzung ist die Übertragung der T-DNA auf Kartoffelpflanzen durch Agrobakterien. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass während der Regeneration der transformierten Zellen prinzipiell jede Zelle des behandelten Pflanzengewebes zur Bildung einer intakten Pflanze in der Lage ist. Im Falle von Kartoffel liegt das Verhältnis mit einer transgenen Pflanze aus etwa 10000 Regeneraten ungünstig (M. Reichmann, pers. Mitteilung). Fortschritte in der Technik der Mikromanipulation werden dazu führen, dass über Injektion von Genkonstrukten Einzelzellen gezielt transformiert werden können (Holm et al., 2000). Zu erwarten ist, dass Regenerate aus diesen Ansätzen tatsächlich auch die übertragenen DNA-Sequenzen tragen.

- Inzwischen wurde die Homologe Rekombination als Methode für die Eliminierung der überflüssigen DNA-Sequenzen in der Pflanzen untersucht (Zubko et al., 2000; Siebert & Puchta, 2002). Die Transformationskassette, die von den homologen DNA-Sequenzen flankiert ist, wird durch homologe Rekombination entfernt. Integration der fremden Gene in das Plastiden Genom hat große Vorteile, weil in vielen Getreide Plastiden vom mütterlichen Elternteil vererbt werden und damit die Verbreitung des Transgens verhindert wird. Außerdem wird das transformierte Gen, das durch homologe Rekombination in den Chloroplasten gezielt integriert ist, hoch exprimiert (Hohn, Levy & Puchta, 2001).
- Es ist möglich mit dem negativen Selektionssystem in der Pflanze Markergen und Zielgen zu trennen (Struzyna et al., 2004). Marker und Zielgen werden durch Kreuzung und anschließende Segregation oder durch Anwendung von Transposasen bzw. Rekombinasen entkoppelt, d.h. sie liegen auf unterschiedlichen genomischen Abschnitten oder werden bereits vollständig entfernt. Durch Behandlung mit N-Acetyl-Phosphinothricin werden markerhaltige F1-Pflanzen eliminiert. Der Nachteil dieses Systems liegt in folgenden Bereichen: 1) Sie sind für die meisten Pflanzenarten nicht etabliert und nur ein Teil der transformierten Pflanzen überlebt die Selektion (Zitiert nach Schlüter & Potrykus, 1996). 2) Manche N-Acetyl-Phosphinothricin (N-AC-PPT) Präparationen können schon vornherein phytotoxisch wirken, was auf eine Verunreinigung mit Phosphinothricin bei der chemischen Synthese zurückzuführen ist (Struzyna et al., 2004; Risse, 2002).
- Mit Hilfe des negativen Selektionssystems (bei Behandlung mit N-AC-PPT) werden die jeweiligen Pflanzen erhalten, die das mit Markergenen gekoppelte N-AC-PPT Deacetylasegen nicht mehr tragen (*argE*). Linien, die aber noch *argE*-Sequenzen enthalten, sterben ab. Vor kurzem wurden alternative Markergene für Pflanzen entwickelt, welche als „positiver“ und gleichzeitig als „negativer“ Selektionsmarker eingesetzt werden können. Das ursprünglich aus einer Hefe stammende *dao1*-Gen wurde in Arabidopsis eingesetzt. Im ersten Schritt wurde mit dem *dao1*-Markergen ein gewünschtes Gen übertragen und die transformierten Zellen identifiziert. In einem zweiten Schritt konnte das Markergen wieder entfernt und markerfreie Pflanzen durch „negative“ Selektion identifiziert werden (Erikson et al., 2004).
- Eine hoch interessante Strategie zur Erzeugung markerfreier Pflanzen ist der Einsatz von Rekombinasen (Hare & Chua, 2002). Diese Rekombinasen werden zu der Integrase (Int)- und Resolvase (Res)-Familie gezählt (Sadowski, 1993). Mitglieder der Integrase Familie z.B. Cre und FLP Rekombinase katalysieren außer der Deletions- die Inversions- und Reintegrationsreaktionen (Gilbertson, 2003; Kibly et al., 1995). Die Resolvasen wie z.B.  $\gamma\delta$  Resolvase katalysieren die Deletionsreaktionen

(Schwikardi & Dröge et al., 2000, 2001). Diese Enzyme befähigen Bakteriophagen, Bakterien und Hefen, DNA-Segmente zu bewegen. Ihr Einsatz bei der Transformation von Kulturpflanzen kann zu einer spezifischen Entfernung unnötiger DNA-Abschnitte führen. Für die Pflanzen wurden folgende sequenzspezifische Rekombinationssysteme entwickelt: das *Cre/lox* Rekombinationssystem (Gilbertson, 2003), das *FLP/FRT* Rekombinationssystem (Kibly et al., 1995) das „*R-RS*“-System (Onouchi et al., 1995) und das *Gin/gix* Rekombinationssystem (Maeser & Kahmann, 1991). All diesen Ansätzen ist gemein, dass das für die Markergenentfernung integrierte Rekombinasegen z.B. durch Kreuzung wieder aus den transgenen Pflanzen entfernt werden kann. In Plastiden (Tabak) wurde die genetische Veränderungen bei der Eliminierung von Markergenen durch Nutzung des *Cre/lox* Systems gezeigt, bzw. wurde Chloroplasten-DNA ausgeschnitten (Corneille et al., 2001; Hajdukiewicz et al., 2001). Vor kurzem gelang mit dem *Cre/lox* System die Erzeugung Markergen-freier transplastomer Tabakpflanzen direkt in der ersten Generation (Klaus et al., 2004).

#### **4.6. Bewertung der Biosicherheit unserer Pflanzen**

##### **4.6.1. Horizontaler Gentransfer durch Persistenz der Gene in der Umwelt**

Der Einsatz markerfreier transgener Pflanzen ist vorteilhaft, um beim Anbau von transgenen Pflanzen eine mögliche Verbreitung von Antibiotika-Resistenzmarkern unter landwirtschaftlichen Produktionsbedingungen zu unterbinden. Dazu gehören kerntransformierte Pflanzen und auch manche transplastome Linien. Chloroplasten-Transformanten gelten theoretisch als „biologisch sicherer“ (Maliga 1993, Daniell et al. 2002b), da solche Pflanzen auf Grund der Biologie der pflanzlichen Reproduktion grundsätzlich Transgen-freien Pollen enthalten und deshalb keine weitere Verbreitung durch sexuelle Vermehrung erfolgen kann (Corriveau und Coleman 1988). Bislang erfolge der kommerzielle Anbau von transgenen Pflanzen ausschließlich mit kerntransformierten Organismen.

##### *Einfluss der transgener Pflanzen auf Mikroorganismen*

Mikroorganismen kommen überall an der Pflanze vor: am Blatt, an der Wurzel, in der Rhizosphäre und im Boden. Es kann in all diesen Bereichen zu Einflüssen kommen. z.B. wird durch einer Pflanze, die bakteriozide Aktivität hat, die Anzahl an Mikroorganismen im Boden

reduziert. Dabei ist nicht wichtig, ob diese Pflanze Transgen ist oder nicht. Wichtig ist, dass z.B. ein Protein exprimiert wird, welches Bakterien abtöten kann. Die bakterioziden Substanzen können auf andere Mikroorganismen im Boden wirken z.B. können wachstumshemmende Organismen gefördert werden oder im Gegenteil genauso gut wachstumsfördernde Bakterien angereichert werden (Broer, 2002).

Eine weitere Beeinflussung auf Mikroorganismen wäre horizontale Gentransfer. Die neuere umfassende Erforschung der Gentransferprozesse (Konjugation, Transformation und Transduktion) in Bakteriellen Lebensräumen zeigt, dass Gentransfer wohl überall möglich ist, jedoch nur sehr selten stattfindet. Bei horizontalem Gentransfer könnte das Risiko bestehen, dass sich die rekombinierte DNA ausbreitet (Wackernagel et al., 2002). Dadurch kann es eine ganze Reihe von Einflüssen auf andere Organismen im Ökosystem geben, natürlich auch auf Insekten (Broer, 2002). Die Möglichkeit eines Transfers von Genen aus transgenen Pflanzen auf Bakterien ist unvergleichlich niedriger als die geringe Möglichkeit des natürlichen Gentransfers zwischen Bakterien (Wackernagel et al., 2002).

Ein hypothetischer horizontaler Gentransfer aus einer Pflanzen auf Bakterien könnte stattfinden, wenn die folgende Schritte zusammen eintreten: 1) Aus der Pflanzenzelle muss die DNA in intakter Form freigesetzt werden. Aber meistens wird diese DNA durch pflanzeigene Nukleasen degradiert, auch im Verdauungstrakt von Säugern, im Boden und im Mikroorganismen sind DNAsen. Z.B. wird hochmolekulare DNA innerhalb von Minuten durch die in Abwässern vorhandenen Nukleasen zerstört, während ihre Halbwertszeit in Frischwasser und Meerwasser 3-83 h beträgt sowie 9-28 h im Boden (Lorenz & Wackernagel, 1994). 2) Die Bakterien müssen freigesetzte DNA aufnehmen. Bislang wurde nur bei zwei Bodenbakterienarten die Aufnahme und stabile Expression von DNA im Natur nachgewiesen (Nielsen et al., 1998; Sikorski et al., 1998). Darüber hinaus ist die DNA-Aufnahmefähigkeit unter den physiologischen Bedingungen des jeweiligen Habitats selbst bei diesen ein sehr seltenes Ereignis. 3) Etablierung eines DNA-Fragments in der Bakterienzelle, z.B. durch Integration ins Genom mittels legitimer oder illegitimer Rekombination, oder in seltenen Fällen durch Ringschluss zu einem Plasmid (Wackernagel et al., 2002). 4) Expression des übertragenen DNAs unter bestimmte Bedingungen (Wackernagel et al., 2002).

Wenn das alles eintritt, könnte sich dieses Bakterium ausbreiten. Dann müsste man sich fragen um welche Eigenschaft es sich handelt, ob es einen Schaden darstellt und, was sehr wichtig ist, ob die Vermehrung dieser Population stabil oder kurzzeitig im Boden vorhanden ist (Broer et al., 2002). Da jeder der vier beschriebenen Schritte für sich alleine schon sehr selten auftritt, scheint ein horizontaler Gentransfer von Pflanze auf Mikroorganismen eher unwahrscheinlich (Dröge et al., 1998; Nielsen et al., 1998). Wenn man über solchen Gentransfer spricht, denkt man an gentechnisch veränderten Pflanzen. Grundsätzlich muss man berücksichtigen, dass alle in einem Organismus vorhandenen Gene mit der gleichen

Wahrscheinlichkeit wie das Transgen auf andere Mikroorganismen übertragen werden könnte (Broer, 2002). Bislang wurde weltweit noch von keinem solchen Schaden berichtet, obwohl bereits 2005 die weltweite Gesamtanbaufläche von genverändertem Saatgut bei etwa 5 % lag (ISAAA, Cliver James).

Die Transformationshäufigkeit hängt von Umweltparametern wie pH-Wert, der Temperatur, dem Adsorbtionsmaterial und der Art von DNA ab (Schlüter & Potrykus, 1996). Bei einem pH-Wert von 1 konnten keine bakteriellen Transformanten mehr gefunden werden, wahrscheinlich weil die DNA teilweise denaturiert ist (Khanna & Stotzky, 1992). Obwohl eine Transformation temperaturabhängig ist, wird sie in einem großen Temperaturbereich von 0-45°C stattfinden (Khanna & Stotzky, 1992). Die Transformationseffizienz hängt außerdem von dem Mineralien ab, an die die DNA adsorbiert. Sie wird kleiner, wenn z.B. die DNA an sich im Grundwasser befindende Partikel bindet (Romanowsky et al., 1993b), während sie erhöht ist für an Sandkörnchen gebundene DNA (Lorenz et al., 1988).

Die Transformationsfrequenz ist unterschiedlich für Plasmid- und chromosomale DNA. Die Ergebnissen von Romanowsky (1993b) und Chamier (1993) zeigen, dass in natürlicher Umgebung chromosomale DNA eine stärkere Transformationsaktivität aufweist als Plasmid DNA (Schlüter & Potrykus, 1996).

Die Experimente an Kartoffeln (auch an konventionellen Kartoffeln) haben in Labor eindeutig gezeigt, dass ein Transfer von pflanzlicher DNA in Bakterien stattfindet, wenn im Genom der Bakterien zu der transgenen DNA homologe, d.h. nahezu identische Sequenzen vorhanden sind (Smalla et al., 1998). Die Arbeitsgruppe von Nielsen et al., (2000) erweiterten das Experiment von Smalla (1998) indem sie die Untersuchungen in steriler Erde nach Zugabe von Nährstoffen durchführten. Auch hier könnten die Bakterien (*Acinetobacter sp. Stamm*) das *nptII*-Gens aus der transgener Zuckerrüben aufnehmen und exprimieren. Aber was im Labor schön zu zeigen ist, wurde im Freiland bisher noch nie gefunden. Es gilt auch für das *Bacillus thuringiensis* Toxin, das ebenfalls Bakterien im Boden nicht schädigt (Broer et al., 2002). Die Untersuchungen an gentechnisch veränderte Mais heben ergeben, dass ein Auskreuzen des Transgens in die freie Natur theoretisch möglich ist. Diese könnte zu ein Ökoschaden durch horizontalen Gentransfer oder durch Schädigung von Insekten führen (Weber et al., 2005). Daher werden vor Zulassung einer transgene Pflanze eingehende Prüfungen zur Verträglichkeit des Transgens und nach Inverkehrbringen eine fortwährende kritische Kontrolle von neutraler Seite durchgeführt. Diese Vorgehensweise ist in der Europäischen Union gesetzlich streng geregelt.

### *Bewertung der Biologische Sicherheit der Antibiotika-Resistenzgene im Genom transgener Pflanzen*

Bevor gentechnisch veränderte Organismen (GVOs) in Deutschland und in der Europäischen Union freigesetzt und in Verkehr gebracht werden können, wird nach dem Gentechnikrecht eine Risikobewertung des jeweiligen GVOs vorgenommen. Bei diese Risikobewertungen werden die Auswirkungen des neuen Genprodukts auf das Verhalten und die Eigenschaften der GVOs bewertet.

Für die Sicherheitsbewertung von gentechnisch veränderten Pflanzen spielen Antibiotika-Resistenzgene eine große Rolle. Es bestehen Befürchtungen, dass Erbinformationen aus Lebensmitteln, die aus transgenen Pflanzen mit Antibiotika-Resistenzgenen stammen, auf human-pathogene Bakterien übertragen werden und damit die therapeutische Anwendung in der Medizin vereiteln. Mit markerfreien Pflanzen aus dieser Arbeit, können diese Überlegungen auf die verbliebene T-DNA reduziert werden. Grundsätzlich besteht hier aber ein vergleichbares, wenn auch zumindest in der Umwelt nicht messbares Risiko.

### *Gentransfer bei Bakterien*

In den Fünfziger Jahren wurden in Laborversuchen drei verschiedene Mechanismen entdeckt durch die bestimmte Bakterien DNA auf andere Zellen übertagen können. 1) Konjugation, dadurch können Plasmide in Bakterien der gleichen Art oder in weit entfernte Arten gelangen, es können aber auch bestimmte Transposons und gelegentlich chromosomale Gene weitergeben werden (Clewell et al., 1993). 2) Bakterien besitzen die Fähigkeit freie DNA-Moleküle aus ihrer Umgebung aktiv aufnehmen zu können. Wenn z.B. Homologie der Nukleotidsequenzen die erforderliche Rekombination ermöglicht, dann kann die aufgenommene DNA als Genetisches Material in Genom integriert werden (Lorenz und Wackernagel, 1994). 3) Die DNA ist auch durch Bakterienviren (*Bakteriophagen*) übertragbar. Diese DNA wir dann bei einer Infektion in eine andere Zelle überführt (Transduktion; Masters, 1996).

Die Wahrscheinlichkeit der Transformation von Bodenbakterien mit dem *nptII*-Gen aus Ernterückständen transgener Pflanzen bei Bakteriellen Rezipienten, die wie *Bacillus subtilis* ein effizientes Transformationssystem, aber keine Homologie zur aufgenommenen DNA besitzen, liegt bei  $2 \times 10^{-11}$  bis  $2,7 \times 10^{-17}$ , und bei Bakteriellen Rezipienten, wie *Agrobacterium tumefaciens*, die kein effizientes Transformationssystem, aber Homologie zur aufgenommenen DNA besitzen, bei  $2 \times 10^{-14}$  bis  $1,3 \times 10^{-21}$  (Schlüter & Potrykus, 1996). Aber die Wahrscheinlichkeit der Gen-Übertragung durch Konjugation zwischen Boden- und Enterobakterien pro Spendezelle liegt bei  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  (Dröge et al., 1998).

Der Fragestellung, ob ein horizontaler Gentransfer von gentechnisch veränderter Pflanzen, welche ein Antibiotika-Resistenzgenen unter der Kontrolle bakterieller Regulationssequenzen

in das Pflanzengenom integriert haben, auf Bakterien stattfinden kann, wird in den letzten Jahren mit immer optimierteren Bedingungen nachgegangen (Chambers et al., 2002). Es wurden Fütterungsversuche an Hühnern mit gentechnisch veränderter Mais durchgeführt, welcher das Antibiotika-Resistenzgen *bla* enthielt. *bla* könnte im Kropf und im Magen der Hühner nachgewiesen werden, jedoch nicht im Darm. Weil ein einziger Bruch in der codierende Sequenz genügt, um ein Gen funktionsunfähig zu machen ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein intaktes Gen die Passage durch den Verdauungstrakt übersteht, ist äußerst gering (Chambers et al., 2002).

Desweiteren müssen für die Herstellung transgener Pflanzen die Expressionsvektoren so konstruiert werden, dass eine Expression der übertragenen Gene nur spezifisch in dem Zielorganismus erfolgt. Man geht davon aus, dass die stabile Expression eines Transgens reduziert werden kann, wenn die für die Transformation verwendeten Sequenzen (1) pflanzliche Promotoren enthalten, (2) Introns enthalten, da bakterielle Gene keine Introns besitzen, sind die Bakterien nicht in der Lage, eukaryotische Introns aus einer mRNA herauszuschneiden und (3) für ein inaktives Proprotein kodieren, das erst bestimmten Veränderungen unterzogen werden muss, um aktiviert zu werden (Schlüter & Potrykus, 1996).

Zusammenfassend liegt in der Natur eine so hohe Variabilität vor, dass vor diesem Hintergrund nur dann Einflüsse durch transgenen Pflanzen bemerkt werden, wenn sie stärkere oder ähnliche Effekte bewirken als z.B. die Jahreszeiten, die Bodenzusammensetzung und Bearbeitung, oder der Wassergehalt. Wenn es zu solchen messbaren Veränderungen kommen würde, dann wäre zu erwarten, dass an der Pflanze selber Auswirkungen zu sehen sind (Broer et al., 2002).

#### **4.6.2. Vertikaler Gentransfer**

Die eingeführten Eigenschaften können sich auf andere Pflanzen aufgrund von Pollenflug und Bestäubung durch Insekten verbreiten, wenn sie sexuell mit verwandten Arten kreuzbar sind. Dafür ist Voraussetzung, dass beide Partner gleichzeitig zur Blüte kommen. Handelt es sich um Herbizidresistenzen, so könnten unerwünschte, schwer bekämpfbare, mehrfach resistente Pflanzen entstehen. Wie groß das Risiko der Auskreuzung ist, unterscheidet sich von Art zu Art, z.B. bei Pflanzen wie Monagold, Rote Beete, Futterrüben und wilde Rüben, die alle die zu der Art *Beta vulgaris* gehören (Dietz-Pfeilstetter et al., 1998; 1999b) wird das Risiko hoch eingeschätzt. Auch hier gilt, dass das Auskreuzungsrisiko transgener Pflanzen gleich hoch wie bei konventionell gezüchteten, Herbizid-resistenten Pflanzen ist. Das Szenario einer Multiresistenzbildung wird durch die Vermeidung transgener Pflanzen nicht unwahrscheinlicher aber auch nicht wahrscheinlicher.

Für Kartoffeln wird das Risiko von Gentransfer auf gentechnisch unveränderte Nutzpflanzen der selben Art oder auf nahe verwandte Wildarten relativ niedrig eingeschätzt. Ein Übertragung von Fremdgenen auf mit Kartoffel kreuzbare Wildarten ist in den Ursprungsgebieten der Kartoffel (Bolivien, Peru) möglich. Die in Europa verbreitete Wildarten *Solanum dulcamara* (Bittersüßer Nachtschatten) und *Solanum nigrum* (Schwarzer Nachtschatten) bilden mit *Solanum tuberosum* keine lebensfähigen Hybride (Dale et al., 1992). Außerdem sind die europäischen Kartoffelsorten nicht winterhart. Die Knollen keimen in der Regel im Folgejahr nicht wieder aus, besonders wenn sie nicht tief im Boden liegen. Kommt es aber trotzdem zum Durchwuchs, sind die Pflanzen bei Anwendung der guten landwirtschaftlichen Praxis und Fruchtfolge leicht zu erkennen und zu entfernen (Eberhardt, 2005).

Kartoffel ist wind- und insektenbestäubt und sowohl selbst- als auch fremdbefruchtend. Die Vermehrung von Kartoffel erfolgt aber vegetativ über Knollen. Die Pollen von Kartoffel wird weniger als 20 m übertragen, daher ist auch bei einer erhöhten Pollenproduktion kein erhöhtes Risikopotenzial zu erwarten. Durch Beibehaltung eines Sicherheitsabstandes von 20 m zur Grenze der Versuchsfläche wird daher eine Pollübertragung auf Kartoffelfelder außerhalb des Versuchsgeländes vermieden (Dale et al., 1992). Da bei Bestäubung mit GV Pollen nur die Frucht der Nachbarkulturpflanze gentechnisch verändert wird, nicht die ganze Pflanze, ist die Möglichkeit, Nachbarkulturen zu verunreinigen, als eher gering eingeschätzt. Im Gegensatz zu Mais wird bei Kartoffel die Knolle und nicht die Frucht genutzt.

Bislang wurden an der LfL seit 1999 Freilandversuche mit gentechnisch veränderten Kartoffeln, die einen anti-sense Abschnitt des kartoffeleigenen *GBSS*-Gens enthalten, durchgeführt. Bis auf das eingeführte Merkmal verhalten sich solche Pflanzen wie die ursprüngliche Ausgangspflanze. Die Stabilität der Expression der Anti-sense Sequenzen bleibt auch nach sieben Jahren Feldanbau erhalten. Unerwartete Ereignisse wie z.B. eine gesteigerte Persistenz oder ein möglicherweise unkontrollierbares Ausbreiten der transgene Pflanzen wurde in den langfristig angelegten Untersuchungen noch nicht beobachtet.

Die markerfreien Pflanzen aus dieser Arbeit stellen eine besonders sichere Möglichkeit der Überprüfung von transgene Pflanzen in der Landwirtschaft dar, da ausschließlich kartoffeleigene Gensequenzen übertragen wurden, keine neuen Genprodukte mit Allergenpotential hergestellt werden und besonders weil keine fremden Antibiotika-Resistenzgene enthält sind, die sich möglicherweise ausbreiten könnten und langfristig einen wirtschaftlichen Schaden hervorrufen könnten. Allerdings muss hier im Einzelfall überprüft werden, ob Effekte durch Anwendung eines Resolvase-Systems und durch den Verbleib von 28 bp *res*-Sequenzen zu messen sind.

## 5. Zusammenfassung

Zur Zeit stehen mehrere Technologien zur Verfügung, Markergene aus transgenen Pflanzen zu entfernen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine neuartige Methode zur Herstellung Markergen-freier, transgener Pflanzen entwickelt werden. Die Entfernung der Markergene erfolgte über ein bestimmtes sequenzspezifisches Rekombinationssystem - das  $\gamma\delta$  Resolvase/*res* System. Die  $\gamma\delta$  Resolvase katalysiert intramolekulare Deletionsreaktionen. Unerwünschte Inversionen – oder Reintegrationsereignisse, die Integrität und Stabilität des Pflanzengenoms unkontrollierbar beeinflussen können, werden von  $\gamma\delta$  Resolvase prinzipiell nicht katalysiert. Durch sequenzspezifische Rekombination werden die problematischen Markergen-Sequenzen vollständig eliminiert und die übertragenen DNA-Sequenzen ausschließlich auf funktionell notwendige Elemente beschränkt. Deswegen soll das  $\gamma\delta$  Resolvase/*res* Rekombinationssystem bei der Herstellung transgener Pflanzen zur sicheren Entfernung von Markergen-Sequenzen genutzt werden.

Es wurden zum einen acht verschiedene Expressionskonstrukte für Kartoffel erstellt, wobei  $\gamma\delta$  Resolvase-Sequenzen mit optimierter Kodonzusammensetzung unter der Kontrolle eines 35S - Promotors stehen. Bei der Gensynthese wurden translationale „leader“-Sequenzen an das 5' Ende des  $\gamma\delta$  Resolvase Gens fusioniert. Zum anderen wurden vier verschiedene Zielplasmide erzeugt, die *res*-flankierten DNA-Sequenzen zwischen einem Promotor (P35S) und *gus*-Reportergen tragen.

In diesem Forschungsprojekt wurde ein für Kartoffeln angepasstes  $\gamma\delta$  Resolvase/*res* System untersucht.

Die entsprechenden Gensequenzen wurden mit synthetischen Oligonukleotiden in PCR Ansätzen hergestellt. Das neuartige  $\gamma\delta$  Resolvase Gen besitzt für Kartoffeln optimierte Kodonzusammensetzungen und neuartige Schnittstellen im offenen Leserahmen. Es wurden ein  $\gamma\delta$  Resolvase Gen, das für eine  $\gamma\delta$  Resolvase mit ursprünglicher Aminosäureabfolge, und acht weitere  $\gamma\delta$  Resolvase Varianten synthetisiert. Entsprechenden Expressionskonstrukte zur Produktion von  $\gamma\delta$  Resolvase in Kartoffelprotoplasten wurden erzeugt. Es wurden 114 bp und 28 bp langen *res*- Sequenzen in *gus*-Reportergenkonstrukten eingeführt.

Das System wurde in einem weiter entwickeltem transienten Testsystem auf Basis von Kartoffelprotoplasten untersucht und dessen Funktionsfähigkeit gezeigt.  $\gamma\delta$  Resolvase und  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q führen zur genauen Rekombination der Testsubstrate. Dabei waren bereits 28 bp *res*-Sequenzen ausreichend.

Auf Basis unserer Ergebnisse wurden neue T-DNA Plasmide konstruiert mit *asGBSS*-Sequenzen und einem *nptII*-Markergen, das von 28 bp *res* Motiven umgeben ist. In transienten Ansätzen führte  $\gamma\delta$  Resolvase und  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q zur Entfernung des *nptII*-Markers.

Transgene Kartoffeln wurden mit der neuartigen T-DNA hergestellt. *asGBSS* vermittelt in ausgewählten Pflanzen die Bildung von Stärkekörnern mit angereichertem Amylopektingehalt.

Nach Protoplastierung transgener Pflanzen mit *nptII*-Marker und Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase und  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q wurden Pflanzen mit T-DNA ohne Markergen identifiziert. Es wurde die in diesem Vorhaben angestrebte sequenzspezifische Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase von in den Zellkern integrierten T-DNA Sequenzen voll erreicht.

Deswegen kann man zweifelsfrei das  $\gamma\delta$  Resolvase/*res* System zur gezielten Entfernung von Markergenen aus Kartoffelpflanzen eingesetzt werden kann.

## 6. Tabellen

**Tab. 4:  $\gamma\delta$  Resolvase Varianten in Kombination mit pRxl1gus Zielplasmid im transienten Testsystem für einen Nachweis der durch  $\gamma\delta$  Resolvase vermittelten sequenzspezifischer Rekombination.**

N Exp.	Protopl. Cv.	ohne	WT	E102Y	M103I	E124Q	E124K	E102Y E124Q	E102Y E124K	M103I E124K	M103I E124Q
1	Jumbo	1	87	2	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
2	Jumbo	2	80	4	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
3	Ute	0	17	n.u.	0	0	1	n.u.	n.u.	2	n.u.
4	Patrona	2	17	0	1	0	3	51	0	2	0
5	Patrona	0	38	n.u.	2	n.u.	5	52	6	4	1
6	Rita	1	3	n.u.	n.u.	n.u.	6	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
7	Walli	0	15	0	n.u.	n.u.	n.u.	46	n.u.	n.u.	0
8	Walli	0	16	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	30	n.u.	1	0
Mittelwerte		1	34*	3	1	0	4	45*	3	2	0
gesamt		6	273	6	3	0	15	179	6	9	1

Es wurden 8 unabhängige transiente Testansätze (N Exp.) mit Protoplasten (Protopl.) der Cultivare (Cv.) Jumbo, Ute, Patrona, Rita und Walli mit dem Reporterplasmid pRxl1gus jeweils in Kombination mit einem Expressionsplasmid  $\gamma\delta$  (WT),  $\gamma\delta$ E102Y,  $\gamma\delta$ M10I,  $\gamma\delta$ E124Q,  $\gamma\delta$ E124K,  $\gamma\delta$ E102YE124Q,  $\gamma\delta$ E102YE124K,  $\gamma\delta$ M103IE124K und  $\gamma\delta$ M103IE124Q durchgeführt. In den Kontrollreaktionen wurde mit pRxl1gus ohne Expressionsplasmid (ohne) gearbeitet. Blaue Zahlen geben die Anzahl der blau gefärbten Protoplasten pro Reaktionsansatz an. \* Signifikanzgrenzwert im t-Test < 0,02. n.u. nicht untersucht.

**Tab. 5:  $\gamma\delta$  Resolvase Varianten in Kombination mit prxr4gus Zielplasmid im transienten Testsystem für einen Nachweis der durch  $\gamma\delta$  Resolvase vermittelten sequenzspezifischer Rekombination.**

N Exp.	Protopl. Cv.	ohne	WT	E102Y	M103I	E124Q	E124K	E102Y E124Q	E102Y E124K	M103I E124K	M103I E124Q
1	Jumbo	0	38	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
2	Jumbo	2	35	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	3	n.u.	n.u.
3	Jumbo	1	24	0	1	2	3	n.u.	2	n.u.	n.u.
4	Walli	0	9	n.u.	0	0	4	n.u.	3	n.u.	n.u.
5	Walli	2	13	4	n.u.	n.u.	n.u.	21	n.u.	6	1
6	Walli	1	11	3	0	0	4	23	3	6	1
7	Patrona	3	6	0	1	3	0	100	1	0	3
8	Patrona	0	8	n.u.	0	1	1	26	0	n.u.	0
9	Patrona	2	7	0	1	4	0	230	1	0	3
10	Patrona	0	5	0	1	1	n.u.	43	6	0	1
Mittelwerte		1	16*	1	1	2	2	74*	2	2	2
gesamt		11	156	7	4	11	12	443	14	12	9

Es wurden 10 unabhängige transiente Testansätze (N Exp.) mit Protoplasten (Protopl.) der Cultivare (Cv.) Jumbo, Ute, Patrona, Rita und Walli mit dem Reporterplasmid prxr4gus jeweils in Kombination mit einem Expressionsplasmid  $\gamma\delta$  (WT),  $\gamma\delta$ E102Y,  $\gamma\delta$ M10I,  $\gamma\delta$ E124Q,  $\gamma\delta$ E124K,  $\gamma\delta$ E102YE124Q,  $\gamma\delta$ E102YE124K,  $\gamma\delta$ M103IE124K und  $\gamma\delta$ M103IE124Q durchgeführt. In den Kontrollreaktionen wurde mit prxr4gus ohne Expressionsplasmid (ohne) gearbeitet. Blaue Zahlen geben die Anzahl der blau gefärbten Protoplasten pro Reaktionsansatz an. \* Signifikanzgrenzwert im t-Test < 0,02. n.u. nicht untersucht.

**Tab. 6:  $\gamma\delta$  Resolvase Varianten in Kombination mit prxR2gus1 Zielplasmid im transienten Testsystem für einen Nachweis der Hemmung eines *gus*-Reportergens.**

N Exp.	Protopl. Cv.	ohne	WT	E102Y	M103I	E124Q	E124K	E102Y E124Q	E102Y E124K	M103I E124K	M103I E124Q
1	Jumbo	314	0	>1000	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
2	Jumbo	314	0	500	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
3	Rita	100	7	n.u.	n.u.	n.u.	3	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
4	Rita	500	8	n.u.	n.u.	n.u.	4	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
5	Patrona	690	0	0	1	0	0	2	0	4	0
6	Patrona	250	2	3	0	1	0	1	0	0	0
7	Patrona	500	0	0	2	0	0	2	0	0	0
8	Patrona	200	2	3	0	2	1	1	0	0	0
Mittelwerte		358	5	376	1	1	3	1	0	0	0
gesamt		2868	19	1506	3	3	8	6	0	0	0

Es wurden 8 unabhängige transiente Testansätze (N Exp.) mit Protoplasten (Protopl.) der Cultivare (Cv.) Jumbo, Rita und Patrona mit dem Reporterplasmid prxR2gus jeweils in Kombination mit dem Reporterplasmid prxR2gus jeweils in Kombination mit einem Expressionsplasmid  $\gamma\delta$  (WT),  $\gamma\delta$ E102Y,  $\gamma\delta$ M10I,  $\gamma\delta$ E124Q,  $\gamma\delta$ E124K,  $\gamma\delta$ E102YE124Q,  $\gamma\delta$ E102YE124K,  $\gamma\delta$ M103IE124K und  $\gamma\delta$ M103IE124Q durchgeführt. In den Kontrollreaktionen wurde mit prxR2gus ohne Expressionsplasmid (ohne) gearbeitet. Blaue Zahlen geben die Anzahl der blau gefärbten Protoplasten pro Reaktionsansatz an. \* Signifikanzgrenzwert im t-Test < 0,02. n.u. nicht untersucht.

**Tab. 7:  $\gamma\delta$  Resolvase Varianten in Kombination mit pRxR3gus Zielplasmid im transienten Testsystem für einen Nachweis von Gus Aktivität.**

N Exp.	Protopl. Cv.	ohne	WT	E102Y	M103I	E124Q	E124K	E102Y E124Q	E102Y E124K	M103I E124K	M103I E124Q
1	Jumbo	750	700	200	5	220	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
2	Jumbo	500	500	150	7	200	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
3	Jumbo	100	100	100	5	90	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
4	Combi	>1000	n.u.	>1000	150	155	n.u.	>1000	n.u.	n.u.	400
5	Combi	500	n.u.	500	430	150	n.u.	470	n.u.	n.u.	380
6	Ute	500	450	500	500	500	500	500	8	69	n.u.
7	Ute	500	440	500	500	500	50	500	7	75	n.u.
8	Patrona	777	600	500	426	32	9	600	n.u.	60	390
9	Patrona	500	450	200	400	30	9	500	0	18	300
10	Patrona	500	500	n.u.	n.u.	40	3	500	20	10	n.u.
Mittelwerte		562	467*	405*	269	191	114	581*	11	46	367
gesamt		5627	3740	3650	2423	1917	571	4070	35	232	1470

Es wurden 10 unabhängige transiente Testansätze (N Exp.) mit Protoplasten (Protopl.) der Cultivare (Cv.) Jumbo, Combi, Ute und Patrona mit dem Reporterplasmid pRxR3gus jeweils in Kombination mit einem Expressionsplasmid  $\gamma\delta$  (WT),  $\gamma\delta$ E102Y,  $\gamma\delta$ M10I,  $\gamma\delta$ E124Q,  $\gamma\delta$ E124K,  $\gamma\delta$ E102YE124Q,  $\gamma\delta$ E102YE124K,  $\gamma\delta$ M103IE124K und  $\gamma\delta$ M103IE124Q durchgeführt. In den Kontrollreaktionen wurde mit pRxR3gus ohne Expressionsplasmid (ohne) gearbeitet. Blaue Zahlen geben die Anzahl der blau gefärbten Protoplasten pro Reaktionsansatz an. \* Signifikanzgrenzwert im t-Test < 0,02. n.u. nicht untersucht.

**Tab. 9: PCR Untersuchungen der putativen Transformanten zur Auswahl transgener Pflanzen mit *res*-flankierter Markergen-kassette.**

Primerkombination							
ag+/neo1		ag1+/neo2		ag1+/ag2-			
pGRKR3	pGRKR4	pGRKR5	pGRKR6	pRKR1	pRKR2	pRKR3	pRKR4
7 <sup>y</sup> ; 8 <sup>y</sup> ; 13 <sup>y</sup> ; 23 <sup>yx</sup> ; 28 <sup>y</sup> ; 31 <sup>y</sup> ; 33 <sup>y</sup> ; 34; 39 <sup>y</sup> ; 47 <sup>y</sup> ; 48; 53; 54 <sup>y</sup> ; 56 <sup>y</sup> ; 57 <sup>y</sup> ; 67; 70 <sup>y</sup> ; 71; 88 <sup>y</sup> ; 91 <sup>y</sup> ; 107 <sup>y</sup> ; 108; 109; 110 <sup>x</sup> ; 111 <sup>y</sup> ; 130 <sup>y</sup> ; 135 <sup>yx</sup> ; 136 <sup>y</sup> ; 137 <sup>y</sup> ; 138 <sup>y</sup> ; 143 <sup>y</sup> ; 156 <sup>y</sup> ; 157; 160; 161 <sup>y</sup> ; 171 <sup>y</sup> ; 219; 221	1; 3; 9; 11; 21 <sup>y</sup> ; 22 <sup>y</sup> ; 29 <sup>y</sup> ; 43; 44 <sup>y</sup> ; 45 <sup>y</sup> ; 63; 77 <sup>y</sup> ; 78 <sup>y</sup> ; 79 <sup>y</sup> ; 82; 86 <sup>y</sup> ; 92 <sup>y</sup> ; 93 <sup>yx</sup> ; 103 <sup>y</sup> ; 104 <sup>y</sup> ; 105 <sup>y</sup> ; 112; 113 <sup>y</sup> ; 131 <sup>y</sup> ; 138 <sup>y</sup> ; 139 <sup>y</sup> ; 140 <sup>y</sup> ; 141 <sup>y</sup> ; 144; 145 <sup>y</sup> ; 147; 173 <sup>y</sup> ; 209 <sup>x</sup> ; 212 <sup>x</sup> ; 214 <sup>x</sup> ; 216; 217	4 <sup>y</sup> ; 5 <sup>y</sup> ; 16 <sup>y</sup> ; 17 <sup>yx</sup> ; 18 <sup>x</sup> ; 19 <sup>y</sup> ; 24 <sup>y</sup> ; 25 <sup>y</sup> ; 26; 37; 51 <sup>y</sup> ; 61 <sup>y</sup> ; 62 <sup>y</sup> ; 89; 95 <sup>y</sup> ; 106; 114 <sup>y</sup> ; 115 <sup>y</sup> ; 116; 117 <sup>y</sup> ; 118 <sup>y</sup> ; 119 <sup>y</sup> ; 120 <sup>y</sup> ; 123 <sup>y</sup> ; 124 <sup>y</sup> ; 125 <sup>y</sup> ; 126 <sup>y</sup> ; 127 <sup>y</sup> ; 128 <sup>y</sup> ; 142 <sup>y</sup> ; 162 <sup>y</sup> ; 163; 164 <sup>y</sup> ; 168; 174 <sup>y</sup> ; 182 <sup>yx</sup> ; 183 <sup>yx</sup> ; 184 <sup>x</sup> ; 185 <sup>x</sup> ; 186 <sup>y</sup> ; 187 <sup>y</sup> ; 188 <sup>yx</sup> ; 189 <sup>yx</sup> ; 190 <sup>y</sup> ; 191 <sup>yx</sup> ; 192 <sup>x</sup> ; 193 <sup>yx</sup> ; 220 <sup>y</sup> ; 224 <sup>x</sup> ; 225; 226; 227; 240; 245 <sup>x</sup>	30 <sup>y</sup> ; 41 <sup>y</sup> ; 42 <sup>y</sup> ; 55 <sup>y</sup> ; 58; 64; 72; 73 <sup>y</sup> ; 74 <sup>y</sup> ; 90 <sup>y</sup> ; 97 <sup>yx</sup> ; 98 <sup>y</sup> ; 121 <sup>y</sup> ; 122 <sup>y</sup> ; 132 <sup>yx</sup> ; 133 <sup>yx</sup> ; 134 <sup>y</sup> ; 155 <sup>yx</sup> ; 175; 180 <sup>y</sup> ; 181 <sup>x</sup> ; 235; 246 <sup>x</sup>	76; 102; 260; 294; 295; 308; 334; 335; 358; 359	69; 75; 165; 166; 167; 281	50; 100; 101; 129; 151; 170; 195; 199; 222; 223; 228; 247; 253; 254; 263; 279; 280; 309; 314; 320; 331; 332	154; 176; 177; 178; 198; 301
<b>Summe</b>							
38	37	54	23	10	6	22	6

Die für die jeweiligen Transformationsexperimente eingesetzten T-DNA Plasmide sind oben angegeben. Darunter für die PCR-Analyse verwendete Primerkombinationen. Die Zahlen zeigen die Nummer der jeweiligen Transformanten. 135<sup>yx</sup> bedeutet, dass diese Linie zusätzlich noch in 2 verschiedenen PCRs analysiert wurde: a) mit den Primern ag1+/ag1- (y) und b) mit den Primern neo1/neo2 (x). Die Linien, die einen T-DNA aus den Plasmiden pRKR1-4 tragen wurden auch mit der Primerkombination gbss3/gbss4 untersucht. In dieser Tabelle sind nur die Transformanten gezeigt, die erwartete Fragment enthalten. Es wurden in der PCR-Analyse 232 Linien analysiert und davon 196 transgene Pflanzen mit *res*-flankierter Markergen-kassette identifiziert. Für die einzelnen Transformationsansätze ist die Summe der erzeugten Linien angegeben.

**Tab. 10: Mit Southern blot-Analyse untersuchte putative Transformanden zur Bestimmung der Anzahl der Transgenbanden der transgenen Pflanzen aus Transformationsansätzen mit pGRKR3-6.**

Sonde	981 bp	962 bp	962 bp	994 bp	994 bp
Verdau	<i>XhoI</i>	<i>XbaI</i>	<i>BglII</i>	<i>MluI</i>	<i>BglII</i>
Eine Transgenbanden 250;	1; 23; 29; 54; 57; 58; 73; 90; 97; 105; 116; 119; 135; 138; 155; 158; 160; 171; 185; 191; 283a; 312	17; 19; 23; 33; 34; 47; 54; 57; 62; 89; 115; 116; 119; 121; 125; 126; 130; 143; 163; 160; 161; 164; 191; 192; 193; 219; 220; 224	17; 23; 47; 54; 115; 116; 119; 126; 135; 137; 158; 160; 161; 163; 164; 191; 193; 219; 220; 224; 396	1; 21; 73; 90; 93; 97; 103; 139; 145; 155; 210; 216; 217; 220; 266; 403	1; 21; 93; 73; 103; 145; 155; 217; 266; 350
Zwei Transgenbanden	5; 25; 33; 43; 61; 124; 189; 226	5; 40; 114; 137; 162; 168; 183; 185	183; 185	29; 58; 104; 105; 138; 267; 283a; 312; 401	29; 58; 90; 105; 246; 267; 283a; 312
Drei und mehr Transgenbanden	74; 118; 127	84; 118; 124; 127; 171; 182; 188; 189	84; 118; 124; 171; 182; 188; 189	43; 74	43; 74
Nicht Auswertbar	2; 3; 17; 19; 47; 53; 108; 109; 110; 122; 125; 162; 172; 216; 220	55; 85; 135; 136; 156; 157; 158; 159; 396; 401	5; 19; 57; 62; 89; 114; 125; 126; 127	37; 44; 45; 78; 92; 98; 106; 112; 113; 117; 140; 141; 214; 215; 246; 250	139; 210; 216
Summe der untersuchten Transformanden	48	54	40	43	25

Die Zahlen geben die untersuchten Linien an. Es wurde insgesamt 110 Verschiedene Linien untersucht.

**Tab. 11: Mit Southern blot-Analyse untersuchte Transformanden zur Bestimmung der Anzahl der Transgenbanden der transgenen Pflanzen aus Transformationsansätzen mit pRKR1-4.**

Sonde	981 bp	1962 bp	1962 bp	1927 bp	1927 bp
Verdau	<i>XhoI</i>	<i>BamHI</i>	<i>BglII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>BglII</i>
Eine Transgenbanden	50; 253; 331; 332	75; 177; 178; 198; 354	75; 177	151; 253; 286; 331; 332; 363; 365	100; 247; 254; 279; 294; 314
Zwei Transgenbanden	280	165	165; 166; 167; 282		50; 280;
Drei und mehr Transgenbanden		176	176; 178; 198; 281		170; 195; 199
Nicht Auswertbar		166; 167; 242; 270; 281; 282; 301;	301; 354	295; 322; 335; 360; 393	76; 102; 129; 169; 222; 223; 228; 260; 263; 308; 309;
Summe der untersuchten Transformanden	5	14	12	12	22

Die Zahlen zeigen die Nummer der untersuchte Linien. Es wurde insgesamt 48 verschiedene Linien untersucht.

Tab. 17: Mit PCR und Southern blot untersuchte pGRKR3-6 Linien nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase zur Auswahl markerfreier Pflanzen.

Linie	#17	#23	#57	#93	#97	#135	#189
	613; 616; 617; 649; 650; 651; 652; 653; 654; 656; 845; 936*; 937; 938; 939; 941; 942; 943; 944; 946*; 1420; 1426; 1431; 1435; 1161; 1604; 1605	209; 210; 211; 212; <b>213; 214</b> ; 215; 216; 654*; 656*	523; 524; 525; 526; 527; 528; 529; 532; <b>1115; 1118; 1119</b> ; <b>1120; 1123; 1124</b> ; <b>1125</b>	1810; 1812; 1826 1534; 1535; 1537; 1538; 1542; 1548; 1551; 1552; 1553; 1555; 1556	<b>13; 14; 15; 16; 17; 18</b> ; <b>19; 20; 21; 22; 23; 24</b> ; 25; 26; 27; <b>28<sup>X</sup></b> ; 29; 30; 31; 32; 33; 34; <b>35</b> ; 36; <b>45; 46; 47; 48; 49; 50</b> ; <b>51; 52<sup>X</sup></b> ; 53; 54; 55; 56; <b>61; 62; 63; 64<sup>X</sup></b> ; 65; <b>66<sup>X</sup></b> ; 67; 68; 69; 70; <b>71*</b> ; <b>72*</b> ; 73; 74; 75; 76; 77; 80; <b>81</b> ; 82; 83; 84; <b>85*</b> ; <b>87</b> ; <b>88; 89; 90<sup>X</sup></b> ; <b>91<sup>*XR</sup></b> ; <b>92<sup>X</sup></b> ; <b>97; 98<sup>X</sup></b> ; 99; 100; 335; 338; 339; 340; 341; 342; 343; 344; 345; 346; 348; 356*; 357; 358; 359; 360; 362; 368; 369; 618; 619; 620; 621; 622; 636; 637; 638; 639; 640; 641; 734; 735; 736; 737	<i>41<sup>X</sup></i> ; <i>42<sup>X</sup></i> ; <i>43<sup>X</sup></i> ; <i>44<sup>X</sup></i> ; <i>129; 130; 131<sup>X</sup></i> ; <i>132</i> ; <b>145; 146; 147; 148</b> ; 149; 150; 151*; <b>152*</b> ; 153; 155; 157; 159; <i>161; 163<sup>X</sup></i> ; <i>164<sup>X</sup></i> ; <b>165</b> ; 166; 167; 168; 169; 170; 171; 172; <u>177</u> ; 241; 242; 243; 280; 281; 285; 286; 289; 290; 291; 292; 390; 391; 393; <u>395</u> ; <b>396</b> ; <b>397; 398</b> ; 399; 400; 401; 402; 642; 643; 644; 645; <b>658; 659</b> ; <b>660; 661</b> ; 773; <u>774</u> ; 1126; 1129; 1401; 1402; 1412; <b>1416; 1417; 1418</b> ; <b>1419</b> ; 1841	189; 190; 191; 193; 194; 195; 196; <b>194</b> ; 195; 196; 221; 225; 226; 227; 228; 234; 297; 298; 300; <b>305</b> ; 306; 307; 308
Summe der putativ rekombinierten Pflanzen	3	2	0	0	12	12	0
Summe der untersuchten Pflanzen	27	10	15	14	103	74	23

Die Zahlen zeigen die jeweiligen Nummern der untersuchten Pflanzen. Zuerst wurde transgenspezifische Fragment mit dem Primerkombination 35-2/neo2 und gbss7/ag2- und (die Pflanzen sind mit schwarzen Zahlen dargestellt) amplifiziert. Die Zahlen, die unterstrichen sind, geben die Pflanzennummer, die in der PCR keine Markergen-spezifische Fragment erzeugen. Dann wurden diese Pflanzen in PCR-Ansätzen mit gbss8/ag1+ analysiert, um markerfreie Transgenort zu identifizieren (die Pflanzen sind mit schwarzen Zahlen dargestellt; \* geben die Nummer von der vermutlich markerkerfreie Pflanzen). Kursiv gestellte Zahlen geben die Pflanzennummern, die mit dem ag1+/ag2- Primern untersucht wurden (<sup>X</sup> geben die Nummer von der vermutlich markerkerfreie Pflanzen). #91 wurde in zwei PCR analysiert: a) mit dem Primer gbss8/ag1+ und b) mit dem ag1+/ag2- Primern.

**Tab. 18: Mit PCR untersuchte pGRKR3-6 Linien nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q zur Auswahl markerfreier Pflanzen.**

Linie	#17	#23	#57	#93	#97	#135	#189
	<b>321; 323; 324;</b> 325; 326; 328; <b>606; 607;</b> <b>609; 611; 646; 647;</b> 807; 811; 812; 815; 814; 855; <u>858; 859;</u> <u>860;</u> 861; 862; 864; 865; 866; <b>867;</b> 874; 880; <u>881;</u> 883; 897; 889; 890; 898; 899; 900; 901; 902; 903; 904; 905; 906; 907; 908; <u>911;</u> 915*; <b>916*</b> ; <b>917*</b> ; 919; 920; 921*; <b>922;</b> 923; 924*; 926; 927; 928; 929; 954; 955; 956; 957; <u>958;</u> <u>959;</u> <b>960; 962; 963;</b> <b>964;</b> 972; 973; 974; 975; 978; 982; 1085; 1095; 1099; 1201; 1202; 1987	<b>329; 330; 331; 332;</b> <b>333; 334;</b> 658; 660; 661; 986; 987; 988; 1071; 1072; 1073; 1074; 1076; 1077; 1078; 1079; 1080; 1353; 1532; 1572;	551; 552	542; 547	37; 38; 39; 40; <i>101<sup>X</sup></i> ; 102; <i>103<sup>X</sup></i> ; <i>104<sup>X</sup></i> ; 108; 109; 110; 111; 112; <i>121</i> ; <i>122<sup>X</sup></i> ; <i>123</i> ; <i>124<sup>X</sup></i> ; <b>345; 346;</b> 347; 474; 478; 480; 483; 484; 493; 494; 495; 496; 497; 498; 499; 500; 501; 502*; 503; 504; 505; 506; 507; 508; 509; <b>510*</b> ; 513; 632; 633; 635; 693; 711; 712; 714; 1194; <b>1199; 1287; 1288;</b> <b>1289; 1290; 1291; 1292;</b> <b>1293; 1307; 1308; 1309;</b> 1310; <b>1313;</b> 1318; 1511; 1520; <b>1613<sup>*XR</sup></b> ; 1734; 1735; <b>1950</b>	244; 245; 246; 251; 252; 253; 254	446; 450; 453; 454; 455; 457; 458; 964; 966; <b>967; 968; 969<sup>R</sup></b> ; <b>970;</b> 1040; 1042
Summe der putativ rekombinierten Pflanzen	5	0	0	0	8	0	0
Summe der Untersuchte Pflanzen	81	24	2	2	72	7	15

Die Zahlen zeigen die jeweiligen Nummern der untersuchten Pflanzen. Zuerst wurde transgenspezifische Fragment mit dem Primerkombination 35-2/neo2 und gbss7/ag2- und (die Pflanzen sind mit schwarzen Zahlen dargestellt) amplifiziert. Die Zahlen, die unterstrichen sind, geben die Pflanzennummer, die in der PCR keine Markergen-spezifische Fragment erzeugen. Dann wurden diese Pflanzen in PCR-Ansätzen mit gbss8/ag1+ analysiert, um markerfreie Transgenort zu identifizieren (die Pflanzen sind mit schwarzen Zahlen dargestellt; \* geben die Nummer von der vermutlich markerkerfreie Pflanzen). Kursiv gestellte Zahlen geben die Pflanzennummern, die mit dem ag1+/ag2- Primern untersucht wurden (<sup>X</sup> geben die Nummer von der vermutlich markerkerfreie Pflanzen). #1613 und #1950 wurden in zwei PCR analysiert: a) mit dem Primer gbss8/ag1+ und b) mit dem ag1+/ag2- Primern.

**Tab. 21: Southern blot-Analyse der Regeneraten nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase zur Auswahl markerfreier Pflanzen.**

Linien	#17	#23	#57	#93	#97	#135	#189	#253
$\gamma\delta$	1603;1604;1605	213;214;1643; 1644;1645;1648; 1650;1657;1658; 1660;1661;1662; 1690;1692;1693	1115;1118; 1119;1120; 1121;1123; 1124;1124	1535;1536;1537; 1538;1539;1542; 1545;1546;1548;	13;14;15;17;18;20;21; 22;23;24;28;35;45;46; 52;64;66;71;72;81;85; 87;88;89;90; <u>91</u> ;92;97; 98;1486;1487;1488; 1489;1582;1585;1586; 1587;1642	145;146;147;148;152; 163;164;165;396;397; 398;658;659;660;661; 1416;1417;1418;1419; 1845;1846;1847;1848; 1849	194; 203;305;1558; 1559;1560;1562	261;262;271
$\gamma\delta YQ$	321;323;324;605; 606;607;609;611; 646;647;867;902; 903;916;917;922; 936;960; 962;963	329;330;331;332; 333;334;1532;1533; 1578;1579;1580; 1581;1961;1962; 1965;1966;1967			345;346;1199;1287; 1288;1289;1290; 1291;1292;1293; 1308;1309;1310; 1314;1497;1498; 1499;1500;1501; 1504;1505;1506; 1507;1512;1524; 1526;1528;1608; 1609;1610;1611; 1612;1613;1614; 1615;1618;1619; 1620;1621;1622; 1624;1628;1629; 1766;1768;1769; 1949;1950;1951; 1953;1954;1955; 1956;1957;1958; 1959;1960	252	964;967;968; <u>969</u> ;970	1573;1574; 1575;1577
Summe	23	32	8	9	95	25	12	7

Die Zahlen in der Tabelle zeigen die Pflanzennummer der untersuchte Regenerate nach Behandlung mit  $\gamma\delta$  Resolvase ( $\gamma\delta$ ) oder  $\gamma\delta$  Resolvase E102YE124Q ( $\gamma\delta YQ$ ) der *res*-markergernehaltigen Linien #17, #23, #57, #93, #97, #135, #189 und #253. Es wurde in Southern blot 211 Pflanzen analysiert und davon vier markerfreier Pflanze identifiziert. Die Nummer der markerfreier Pflanzen sind unterstrichen. Die Linien: #23, #57, #135 tragen T-DNA aus pGRKR3, Linie #17 und #189 aus pGRKR5, Linie #93 besitzt T-DNA aus pGRKR4 und die Linie #97 aus pGRKR6. Die Linie #253 enthält T-DNA aus pRKR3.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abdel-Meguid, S.S., Grindley, N.D.F., Templeton, N.S. and Steitz, T.A. (1984). Cleavage of the site-specific recombination protein  $\gamma\delta$  resolvase: the smaller of two fragments binds DNA specifically. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2001-2005.
- Abremski, K., Hoess, R. and Sternberg, N. (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32, 1301-1311.
- Andersson, M., Trifonova, A., Andersson, A., Johansson, M., Bülow, L. and Hofvander, P. (2003). A novel selection system for potato transformation using a mutated *AHAS* gene. *Plant Cell Rep.* 22, 261-267.
- Arnold, P. H., Blake, D.G., Grindley, N.D.F., Boocock, M.R. and Stark, W.M. (1999). Mutants of Tn3 resolvase which do not require accessory binding sites for recombination activity. *EMBO J.* 18, 1407-1414.
- Badrishwili, G. (1963). In: Buch:- "Potato culture in Georgia" (auf Georgisch).
- Battacharyya, M.K., Stermer, B.A. and Dixon, R.A. (1994). Reduced variation in transgene expression from a binary vector with selectable markers at the right and left T-DNA borders. *Plant J.* 6, 957-968.
- Baubonis, W. and Sauer, B. (1993). Genomic targeting with purified Cre recombinase. *Nucleic Acids Res.* 21, 2025-2029.
- Becker, D., Brettschneider, R. and Lorz, H. (1994). Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J.* 5, 299-307.
- Bilang, R., Klöti, A., Schrott, M. and Potrykus, I. (1994). PEG-mediated direct gene transfer and Elektroporation. *Plant Molec. Biol. Manual* A1, 1-16.
- Broer, I. (2002). Ökologische Begleitforschung: Einfluss transgener Pflanzen auf Mikroorganismen. *Diskurs Grüne Gentechnik*.
- Broom, J.E., Hill, D.F., Hughes, G., Jones, W.A., McNaughton, J.C., Stochwell, P.A. and Petersen, G.B. (1995). Sequence of a transposon identified as Tn1000 (gamma delta). *J. Mol. Biol.* 5, 185-9.
- Bryant, J., Leather, S. (1992). Removal of selectable marker genes from transgenic plants: needless sophistication or social necessity? *Trends in Biotech.* 10, 274-275.
- Burchard, W. (1985). Polysaccharide-Eigenschaften und Nutzen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 33-38.
- Chambers, P. A., Duggan, P. S., Heritage, J., Forbes, J. M. (2002). The fate of antibiotic resistance marker genes in transgenic plant feed material fed to chickens. *J Antimicrob Chemother* 49, 161-164.
- Chamier, B., Lorenz, M.G. and Wackernagel, W. (1993). Natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* by plasmid DNA adsorbed on sand and groundwater aquifer material. *Applied and Environmental Microbiology.* 59, 1662-1667.

- Clewell, D.B. (ed). (1993). Bacterial Conjugation. Plenum Press New York, USA.
- Clive James, ISAAA briefs "Global status of commercialised transgenic crops: 2004".
- Clulow, S.A., Wilkinson, M.J., Waugh, R., Bird, E., DeMeine, M.J. and Powell, W. (1991). Cytological and molecular observations on *Solanum phureja*- induced dihaploid potatoes. Theor Appl Genet. 82, 545-551.
- Coppoolse, E.R., de Vroomen, M.J., Roelofs, D., Smit, J., van Gennip, F., Hersmus, B.J.M., Nijkamp, H.J.J. and van Haaren, M.J.J. (2003). Cre recombinase expression can result in phenotypic aberrations in plants. Plant Mol. Biol. 51, 263-279.
- Corriveau, J.P. and Coleman, A.W. (1988). Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. Am J Botany 75, 1443-1458.
- Corneille, S., Lutz, K., Svab, Z. and Maliga, P. (2001). Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system. Plant J. 27, 171-178.
- Dale, E.C. and Ow, D.W. (1991). Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10558-10562.
- Dale, P. J. (1992). Spread of engineered genes to wild relatives. Plant Physiol. 100, 13-15.
- Daniell, H. (2002b). Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. Nat Biotechnol. 20, 581-586.
- De Rocher, J.E., Vargo-Gogola, T.C., Diehn, S.H. and Green, P.J. (1998). Direct Evidence for Rapid Degradation of *Bacillus thuringiensis* Toxin mRNA as a Cause of Poor Expression in Plants. Plant Physiol. 117, 1445-1461.
- de Vetten, N., Wolters, A., Raemakers, K., van der Meer, I., ter Stege, R., Heeres, E., Heeres, P., and Visser, R. (2003). A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. Nat. Biotechnol. 21, 439-442.
- Diaz, V., Rojo F., Martinez-A.C., Anolso J.C. and Bernad A. (1999). The Prokaryotic  $\beta$ -Recombinase Catalyzes Site-specific Recombination in Mammalian Cells. J. Biol. Chem. 276, 6634-6640.
- Diaz, V., Servert, P., Prieto, I., Gonzalez, M.A., Martinez-A, C., Alonso, J.C. and Bernad, A. (2001). New insights into host factor requirements for prokaryotic beta-recombinase-mediated reactions in mammalian cells. J. Biol. Chem. 276, 16257-16264.
- Dietz-Pfeilstetter, A. and Kirchner, M. (1998). Analysis of gene inheritance and expression in hybrids between transgenic sugar beet and wild beets. Mol. Ecol. 7, 1693-1700.
- Dietz-Pfeilstetter, A., Gland-Zwenger, A. & Garbe, V. (1999b): Potential und Bewertung von Auskreuzungen aus gentechnisch verändertem Raps. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 51, 14-19.

- Dillon, P.J. and Craig, A.R. (1990). A rapid method for the construction of synthetic genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 9, 298-300.
- Draper, J., Scott, R., Armitage, P. and Walden, R. (1988). Plant genetic transformation and gene expression. A Laboratory Manual. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Dröge, P. (2001). Resolvase-catalysed, sequence-specific DNA-recombination in eukaryotic cells. WO 01/38511 A2.
- Döge, P. and Cozzarelli, N. R. (1989). Recombination of knotted substrates by Tn3 resolvase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 6062-6066.
- Dröge, M., Pühler, A. and Selbitschka, W. (1998). Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. *Biotech. J.* 64, 75-90.
- Eberstein, K. (1980). *Stärke.* 32, 397.
- Eberhardt, S. (2005). Casualty Risk Consulting Informationen für Versicherer. 21 Gentechnisch veränderte Pflanzen. Münchener Rückversicherungs-Gesellschaft. p.p.1-28.
- Ebinuma, H., Sugita, K., Matsunaga, E. and Yamakado, M. (1997). Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 2117-2121.
- Erikson, O., Hertzberg, M. and Naesholm, T. (2004). A conditional Markergene allowing both positive and negative selection in plants. *Nature Biotech.* 22, 455-458.
- Escobar, C., Hernandez, L.E., Jimenez, A., Creissen, G., Ruiz, M.T. and Mullineaux, P.M. (2003). Transient expression of *Arabidopsis thaliana* ascorbate peroxidase 3 in *Nicotiana benthamiana* plants infected with recombinant potato virus X. *Plant Cell Reports.* 21, 699–704.
- Falvey, E. and Grindley, N.D. (1987). Contacts between gamma delta resolvase and gamma delta res Site. *EMBO J.*3, 815-21.
- Frandsen, N.O. (1967). Haploidproduktion aus einem Kartoffelzuchtmaterial mit intensiver Wildarteinkreuzung. *Der Züchter* 37, 120-134.
- Fromm, M.E., Morrish, F., Armstrong, C., Williams, R., Thomas, J. and Klein, T.M. (1990). Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Biot.* 8, 833-839.
- Ghel-Guerrero, L., Betancur, A.D. and Agric, J. (1998). *Food Chem.* 46, 2087-91.
- Gilbertson, L. (2003). *Cre-lox* recombination: Cre-ative tools for plant biotechnology. *Trends Biot.* 21, 550-555.
- Goldsbrough, A.P., Lastrella, C.N. and Yoder, J.I. (1993). Transposition mediated repositioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Biotech.* 11, 1286-1292.
- Goldsbrough, A.P. (1992). Marker gene removal: A practical necessity? *Trends in Biotech.* 10, 417.

- Gressel, J. (1992). Indiscriminate use of selectable markers-sowing wild oats? *Tibtech*. *10*, 382.
- Grindley, N.D., Lauth, M.R., Wells, R.G., Wityk, R.J., Salvo, J.J. and Reed, R.R. (1982). Transposon-mediated site-specific recombination: identification of three binding sites for resolvase at the *res* sites of gamma delta and Tn3. *Cell*. *30*, 19–27.
- Hajdukiewicz, P.T., Gilbertson, L. and Staub, J.M. (2001). Multiple pathways for *Cre/lox* mediated recombination in plastids. *Plant J*. *27*, 161-170.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: *DNA cloning. A practical approach*. vol. I, Glover D.M. (ed.), IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA. pp.109-135.
- Hare, P.D. and Chua, N. (2002). Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nat. Biotechnol*. *20*, 575-580.
- Hatfull, G.F., Noble, S.M. and Grindley, N.D.F. (1987). The  $\gamma\delta$  resolvase Unusual DNA Structure at the Recombinational Crossover Point. *Dep. of Mol. Biop. and Bioch*. *49*, 103-110.
- Hermesen, J.G.T. and Verdenius, J. (1973). Selection from *Solanum tuberosum* group *Phureja* of genotypes combining high frequency haploid induction with homozygosity for embryo spot. *Euphytica* *22*, 244-259.
- Hoa, T.T., Bong, B.B., Huq, E. and Hodges, T.K. (2002). *Cre/lox* site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. *Theor. Appl. Genet*. *104*, 518-525.
- Hohn, B., Levy, A.A. and Puchta, H. (2001). Elimination of selection markers from transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol*. *12*, 139-143.
- Holm, P.B., Olsen, O., Schnorf, M., Brinch-Pedersen, H. and Knudsen, S. (2000). Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. *Transgenic Res* *9*, 21-32.
- Horlemann, C., Schwekendiek, A., Höhnle, M. and Weber, G. (2003). Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports* *22*, 210-217.
- Horsch, R., Fry, J., Hoffmann, N., Eichholtz, D., Rogers, S. and Fraley, R. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* *227*, 1229-1231.
- Hougas, R.W. and Peloquin, S.J. (1957). A haploid plant of the potato variety Katahdin. *Nature* *180*, 1209-1210.
- Hughes, R.E., Hatfull, G.F., Rice P., Steitz, T.A. and Grindley, N.D.F. (1990). Cooperativity Mutants of the  $\gamma\delta$  resolvase Identify an Essential Interdimer Interaction. *Dep. of Mol. Biop. and Bioch*. *63*, 1331-1338.

- Hutten, R.C.B., Scholberg, E.J.M.M., Huigen, D.J., Hermsen, J.G.T. and Jacobsen, E. (1994). Analysis of dihaploid induction and production ability and seed parent x pollinator interaction in potato. *Euphytica* 72, 61-64.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: beta- glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.
- Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F. and Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43, 179–188.
- Khanna, M. and Stotzky, G. (1992). Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Applied and Environmental Microbiology.* 58, 1930-1939.
- Kilby, N.J., Snaith, M.R. and Murray, J.A. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* 9, 413-421.
- Kilby, N.J., Davies, G.J. and Snaith, M.R. (1995). FLP recombinase in transgenic plants: constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in *Arabidopsis*. *Plant J.* 8, 637-652.
- Klaus, S.M.J., Huang, Fong-Chin., Golds, T.J. and Koop, Hans-Urlich. (2004). Generation of marker-free plastid transformants using a transiently cointegrated selection gene. *Nat. Biot.* 22, 225-229.
- Klippel, A., Cloppenborg, K. and Kahmann, R. (1988) Isolation and characterization of unusual *gin* mutants. *J. EMBO.* 7, 3983–3989.
- Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.* 10, 165-174.
- Konigsberg, M. (1950). US 2, 500-950.
- Koncz, C. and Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-396.
- Kopertekh, L., Jüttner, G., and Schiemann, J. (2004). PVX-Cre-mediated marker gene elimination from transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 55, 491-500.
- Kunkel, T., Niu, Q.W., Chan, Y.S. and Chua, N.H. (1999). Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation. *Nat. Biot.* 17(9):916-9.
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D. and Zakour, R.A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol* 154, 367-382.

- Kriete, G., Niehaus, K., Perlick, A.M., Puhler, A. and Broer, I. (1996). Male sterility in transgenic tobacco plants induced by tapetum-specific deacetylation of the externally applied non-toxic compound N-acetyl-L-phosphinothricin. *Plant J.* 9, 809-818.
- König, A. (2003). A framework for designing transgenic crops--science, safety and citizen's concerns. *Nat. Biotechnol.* 21, 1274-1279.
- Lorbach, E., Christ, N., Schwikardi, M. and Dröge, P. (2000). Site-specific recombination in human cells catalyzed by phage lambda integrase mutants. *J. Mol. Biol.* 296, 1175-1181.
- Lorenz, M.G. and Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58, 563-602.
- Lorenz, M.G., Aardema, B.W. und Wackernagel, W. (1988). Highly efficient genetic transformation of *Bacillus subtilis* attached to sand grains. *J. of General Microbiology.* 134, 107-112.
- Lu, H.J., Zhou, X.R., Gong, Z.X. and Upadhyaya, N.M. (2001). Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-border (DRB) binary vectors. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 241-248.
- Maeser, S. and Kahmann, R. (1991). The Gin recombinase of phage Mu can catalyze site-specific recombination in plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 230, 170-176.
- Maliga, P. (1993). Towards plastid transformation in flowering plants. *Trends Biotechnol.* 11, 101-107.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V. and Gleba, Y. (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transfektion of viral replicons for efficient transient expression in plant. *J. Nat. Biotech.* 23, 718-723.
- Masters, M. (1996). Generalized Transduction. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. (F. C. Neidhardt, ed.), ASM Press, Washington DC, pp. 2421-2441.
- Matzke, M.A., Mette, M.F. and Matzke, A.J.M. (2000). Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol. Biol.* 43, 401-415.
- Meijer, E.G, Schilperoort, R.A., Rueb, S., van Os-Ruygrok, P.E. and Hensgens, L.A. (1991). Transgenic rice cell lines and plants: expression of transferred chimeric genes. *Plant Mol Biol.* 16, 807-820.
- Meyer, P. (2000). Transcriptional transgene silencing and chromatin component. *Plant Mol. Biol.* 43, 221-234.
- Munzert, M. (1990). Die Kartoffel als Stärkepflanze aus züchterischer Sicht. In: *Stärke im Nichtnahrungsbereich*, Schriftenreihe des BML, Angewandte Wissenschaft, Heft 380.

- Muskens, M.W.M., Vissers, A.P.A., Mol, J.N.M. and Kooter, J.M. (2000). Role of inverted DNA repeats in transcriptional and posttranscriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol.* 43, 243–260.
- Nagel R., Elliot A., Masel A., Birch R. G. and Manners J. M. (1990). Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS microbiol. lett.* 67, 325-328.
- Nara, F., Watanabe, I. and Serizawa, N. (1993). Development of a transformation system for the filamentous, ML-236B (compactin) – producing fungus *Penicillium citrinum*. 23, 28-32.
- Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A.R., and Hansen, G. (2000). The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep.* 19, 798-803.
- Newman, B.J. and Grindley, N.D. (1984). Mutants of the gamma delta resolvase: a genetic analysis of the recombination function. 38, 463-469.
- Newell, C.A. (2000). Plant transformation technology. Developments and applications. *Mol. Biotechnol* 16(1):53-65.
- Nielsen, K.M., Bones, A.M., Smalla, K. and van Elsas J.D. (1998). Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria—a rare event? *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 79-103.
- Nielsen, K. M., van Elsas, J. D. and Smalla, K. (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413(pFG4Delta nptII) with Transgenic Plant DNA in Soil Microcosms and Effects of Kanamycin on Selection of Transformants. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1237-1242.
- Nitsche, W. and Wenzel, G. (1977). Haploids in plant breeding. Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg.
- O'Gorman, S., Fox, D.T. and Wahl, G.M. (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 25, 1351-1355.
- Onouchi, H., Nishihama, R., Kudo, M., Machida, Y. and Machida, C. (1995). Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen Genet.* 247, 653-660..
- Osborne, B.I., and Baker, B. (1995). Movers and shakers: maize transposons as tools for analyzing other plant genomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 406-413.
- Ow, D.W. (2002). Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era *Plant Mol. Biol.* 48, 183–200.
- Peschke, V.M. and Phillips, R.L. (1992). Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Adv. Genet.* 30, 41–75.

- Prasher, D.C. (1995). Using GFP to see the light. *Trends Genet* 11(8):320-3.
- Puchta, H. (2000). Removing selectable marker genes: taking the shortcut. *Trends Plant Sci* 5(7):273-4.
- Reed, R.R. (1981). Transposon-mediated site-specific recombination: a defined in vitro system. *Cell* 25, 713-719.
- Reed, R.R., Grant, I., Steitz, S. and J.A. (1982). Nucleotide sequence of *gd* resolvase gene and demonstration that its gene product acts as a repressor of transcription. *Nature* 300, 381-383.
- Rimphanitchayakit, V., Hatfull, G.F. & Grindley, N.D.F. (1990). Saturation mutagenesis of the DNA site bound by the small carboxy-terminal domain of  $\gamma\delta$  resolvase. *EMBO J.* 9, 719-725.
- Risse, J.M., Flaschel, E. and Pühler, A. (2002). Produktion und Analytik von N-Acetyl-Phosphinothricin sowie N-Acetyl-Phosphinothricin-alanyl-alanin. DEHEMA-Jahrestagung in Wiesbaden.
- Romanowski, G., Lorenz, M.G. und Wackernagel, W.. (1993b ). Plasmid DNA in a groundwater aquifer microcosm - adsorption, DNase resistance and natural genetic transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Ecol.* 2, 171-181.
- Sadowski, P.D. (1993). Site-specific genetic recombination: hops, flips, and flops. *FASEB J.* 7, 760-767.
- Saghai Maroof M.A., Jorgensen, R. and Allard, R.W. (1984). Ribosomal spacer length Polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 8014-8018.
- Salvo, J.J. and Grindley, N.D.F. (1988). The  $\gamma\delta$  resolvase bends the *res* site into a recombinogenic complex. *EMBO J.* 7, 3609-3616.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2nd edition, Vol. 1-3).
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sawahel, W.A. (2001). Stable genetic transformation of cotton plants using polybrene spermine treatment. *Plant Mol. Bio. Rep.* 19, 377a-377f.
- Schilde-Rechtschler, L. and Ninnemann, H. (1988). Kombination von Kartoffellinien durch Protoplastenfusion Regeneration zur Regeneration tetraploider züchterisch nutzbarer Hybridpflanzen. *Vortr. Pflanzenzücht.* 14, 149-163.
- Schlüter, K. and Potrykus, I. (1996). Horizontaler Gentransfer von transgenen Pflanzen zu Mikroorganismen (Bakterien und Pilzen) und seine ökologische Relevanz In: E Schulte und O Käppeli (eds) *Gentechnisch veränderte krankheits- und schädlingsresistente Nutzpflanzen. Eine Option für die Landwirtschaft?* Publikation

- des Schwerpunktprogrammes Biotechnologie des Schweizerischen Nationalfonds, Bern, pp. 160-190.
- Schwikardi, M. and Dröge, P. (2000). Site-specific recombination in mammalian cells catalyzed by gammadelta resolvase mutants: implications for the topology of episomal DNA. *FEBS Lett.* 471, 147-150.
- Schwikardi, M. and Dröge, P. (2001). Use of site-specific recombination as a probe of nucleoprotein complex formation in chromatin. *Eur. J. Biochem.* 268, 6256-6262.
- Shen, W.H., Escudero, J., Schlappi, M., Ramos, C., Hohn, B. and Koukolikova-Nicola, Z. (1993). T-DNA transfer to maize cells: histochemical investigation of betaglucuronidase activity in maize tissues. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1488-1492.
- Sherratt, D. (1989). Tn3 and related transposable elements: site-specific recombination and transposition. In *Mobile DNA*, D.E. Berg and M. M. Howe, eds. Microbiology, 163-184.
- Siebert, R. and Puchta, H. (2002). Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *Plant Cell* 14, 1121-1131.
- Sikorski, J., Graupner, S., Lorenz, M.G. and Wackernagel, W. (1998). Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in a non-sterile soil. *Microbiology* 144, 569-576.
- Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W.-T. and Forney, L.: (1998). Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1220-1225.
- Smith, A.M., and Martin, C. (1993). Starch biosynthesis and the potential for its manipulation. In: *Biosynthesis and manipulation of plant products*. Plant Biotech. 3, edited by Grierson, D. Blakie Academic and Professional London. 1-54.
- Stark, W.M., Boocock, M.R. and Sherratt, D.J. (1992). Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet.* 8, 432-439.
- Strizhov, N., Keller, M., Mathur, J., Koncz-Kalman, Z., Bosch, D., Prudovsky, E., Schell, J., Sneh, B., Koncz, C. and Zilberstein, A. (1996). A synthetic *cryIC* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1512-1517.
- Struzyna, C., Neumann, K., Sonntag, K. and Broer, I. (2004). Inducible Cell Death in Transgenic Plants: A System to Obtain Markerfree Transgenic Plants. Universität Rostock.
- Tiemann, H. (1997). Neuzüchtung. In: *Die Erzeugung von Pflanzkartoffeln*, Schumann, P. (ed.), Buchedition Agrimedia, Holm, pp. 31-39.

- Udelgard Körber-Grohne. (1987). In Buch: Nutzpflanzen in Deutschland (Kulturgeschichte und Biologie). Konrad Theiss Verlag, pp. 140-148.
- Vergunst, A.C. and Hooykaas, P.J. (1998). Cre/ lox -mediated site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* by transient expression of cre. *Plant Mol. Biol.* 38, 393-406.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* 23, 4407-4414.
- Wackernagel, W. (2002). Fakten und Fantasien zum horizontalen Gentransfer von rekombinanter DNA. *Akademie J.* pp.28-31.
- Weber, W. E., Bringezu, T., Broer, I., Holz, F., Eder J. und B. (2005). „Koexistenz von gentechnisch verändertem und konventionellem Mais“. In: „mais 1+2/2005“. Die Fachzeitschrift für den Maisanbau.
- Wells, R.G. and Grindley, N.D. (1984). Analysis of the gamma delta res site. Sites required for site-specific recombination and gene expression. *J Mol Biol.* 15, 667–687.
- Wenzel, G., Schieder, O., Prezewozny, S.K. & Melchers, G. (1979). Comparison of single cell culture derived *Solanum tuberosum* L. plants and a model for their application in breeding programs. *Theor. Appl. Genet.* 55, 49-55.
- Wurzberg, O.B. (1960). US 2, 935-510.  
[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)  
[www.Kazusa.or.jp/codon](http://www.Kazusa.or.jp/codon)  
[www.biosicherheit.de/kartoffeln/30.dok.html](http://www.biosicherheit.de/kartoffeln/30.dok.html)  
[www.biosicherheit.de/kartoffeln/14.doku.html](http://www.biosicherheit.de/kartoffeln/14.doku.html)  
[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Yang, W. and Steitz, T.A. (1995). Crystal structure of the site-specific recombinase  $\gamma\delta$  resolvase complexed with a 34 bp cleavage site. *Cell* 82, 193-207.
- Zubko, E., Scutt, C. and Meyer, P. (2000). Intrachromosomal recombination between *attP* regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. *Nat. Biotechnol.* 18, 442-445.
- Zuo, J., Niu, Q.W., Moller, S.G. and Chua, N.H. (2001). Chemical-regulated, site- specific DNA excision in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* 19, 157-161.

## **Danksagung**

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Alfons Gierl für sein Interesse an meiner Arbeit, seine Unterstützung und für die Möglichkeit diese Arbeit in Deutschland durchführen zu können.

Ich bedanke mich Herzlich bei Herr Dr. Michael Reichmann für die zahlreiche Hilfestellungen, viele konstitutive Vorschläge, seine große Hilfsbereitschaft und geduldige Mithilfe bei allen auftretenden Problemen. Ich danke Herr Dr. Reichmann besonders für die Begeisterung und den Optimismus, die er diesem Projekt entgegenbrachte.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hiller danke ich für die vielen nützlichen Tipps und Ratschläge, die er zu jedem Problem anzubieten hatte.

Mein dank gilt auch an Frau Dr. Andrea Schwarzfischer für die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe (Zuchtmethodik und Biotechnologie Kartoffeln (IPZ 3b) durchführen zu können.

Großer Dank gilt an meinen Laborbanknachbarn Brigitte Nadler und Stefanie Gellan, für ihre Unterstützung, die erfolgreiche Klonierungen den Expressionskonstrukten, die Präparationen und Transformationen von Kartoffelprotoplasten, unermüdlichen Arbeitseinsatz, aber die beide waren nicht nur im Labor immer eine große Hilfe!

Weiterhin bedanke ich mich die andre Kolleginnen im Labor: Anita Behn (für die guten fachlichen und auch manchmal fachfreien Gespräche), Hildegard Wiesheu, Melanie Kornbauer, Julia Frauenholz, Renate Enders, Monika Scheur für das Mitgefühl und gute Atmosphäre.

Meine ehemaligen Mitarbeitern (Lehrstuhl für Genetik) möchte ich für ihren Hilfsbereitschaft, guten fachlichen Gespräche und Rat danken, vor allem Frau Dr. Monika Frey, Sebastian Grün, Tilo Fischer und Christine Schäfer (für ihre große Mithilfe bei Rechtschreibung und Computerproblemen).

Zum Schluss bedanke ich mich Herzlich bei meinem Tochter Nino, meinem Mann, bei meinen Eltern und Geschwistern für ihre Unterstützung, ihre Hilfe und ihre Geduld.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Khaliani  
Vorname: Maya  
Geburtsdag: 02.01.1973  
Geburtsort: Sochumi, Georgien  
Familienstand: Verheiratet

### **Schulbildung:**

1979-1990: Mittelschule in Achaldaba, Georgien

### **Studium:**

1991-1996: Iw. Dschawachschwili Universität,  
Sochumer Filial; Diplom

### **Berufliche Tätigkeit:**

2001-2004: Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation an  
der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)  
Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung (IPZ)  
Arbeitsgruppe Zuchtmethodik und Biotechnologie  
Kartoffeln (IPZb)