

**Entwicklung eines *Gene-Trap* Systems für
monokotyle Pflanzen und Untersuchungen zu
seiner Funktion in Gerste (*Hordeum vulgare* L.)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christian Bergmann

aus Hamburg

Hamburg 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. LÖRZ
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. U. WIENAND

Tag der Disputation: 27. Juni 2003

Hamburg, den 13. Juni 2003



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Frühwald".

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Abkürzungen

A. bidest	Aqua bidest
Abb.	Abbildung
Abs.	Absolut
Amp	Ampicillin
cDNA	komplementäre DNA
CIP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
Dig	Digoxigenin
dsDNA	doppelsträngige DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EtOH	Ethanol
EtBr	Ethidiumbromid
kb	Kilobasen
mRNA	messenger (Boten) Ribonukleinsäure
MS	Murashige-Skoog-Medium
n.d.	nicht bestimmt
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TPase	Transposase
TSAP	Thermosensitive Alkalische Phosphatase
TSD	„target site duplication“
ün	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Größenordnungen

c	centi	10^{-2}
k	kilo	10^3
m	milli	10^{-3}
μ	mikro	10^{-6}
n	nano	10^{-9}
p	pico	10^{-12}

Einheiten

bp	Basenpaare	J	Joule	s, sek	Sekunde
°C	Grad Celsius	kb	Kilobasen(paare)	U	Units
g	Gramm	m	Meter	V	Volumen
h	Stunde	M	molar	PSI	pounds per square inch
l	Liter	min	Minute	Pa	Pascal

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Chemikalien	12
2.1.2	Kits und sonstiges Material	12
2.1.3	Geräte und Software	12
2.1.3.1	Splicepredictor	12
2.1.4	DNA-Sequenzanalysen	13
2.1.5	Enzyme	13
2.1.6	Bakterienstämme	13
2.1.7	Pflanzenmaterial	13
2.1.8	Plasmide	14
2.1.9	Längenstandards	14
2.1.10	Primer	15
2.1.11	Pflanzenmedien	16
2.1.12	Lösungen für die Histochemische GUS Färbung	16
2.2	Methoden	16
2.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	16
2.2.2	Biolistischer Transfer von DNA in Gerstenzellen	17
2.2.3	Biolistische Transformation der Testerplasmide	17
2.2.4	Southern-Blot Analyse	18
2.2.5	Chemilumineszens DIG-Nachweisreaktion	18
2.2.6	Histochemische GUS Färbung von Skutellumgewebe	18
2.2.7	Histochemische GUS Färbung von Gerstenkeimlingen	18
2.2.8	Herstellung einer GUS-Gen spezifischen Dig-markierten DNA-Sonde	18
2.2.9	“Footprint” PCR	19
2.2.10	Multiplex-PCR Nachweis von <i>GTDs</i> und <i>cwAcΔ102</i>	19
2.2.11	Sequenzreaktion	19
2.2.12	Reamplifizierung membrangebundener DNA	19
2.2.13	SOE PCR Strategie für die <i>GTDs B</i> Klonierung	20
2.2.14	Klonierung der Exontester	20
2.2.15	RT-PCR Analyse von mRNA aus mit Exontester Konstrukten transformierten Skutella	20

2.2.16	Klonierung der Introntester Konstrukte	21
2.2.17	PCR der Exon Referenzprodukte	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Klonierung des Gene Trap Elementes <i>GTDs B</i>	23
3.1.1	Theoretische Überlegungen zur Entwicklung von <i>GTDs B</i>	24
3.1.2	Klonierung des Gene Trap Elementes <i>GTDs B</i>	27
3.2	Untersuchung zur Funktion der Spleißstellen der <i>GTDs</i> Elemente	28
3.2.1	Untersuchung der Spleißstellenbenutzung bei Integration in ein Exon	29
3.2.2	Untersuchung der 3A Spleißstellenbenutzung	34
3.2.2.1	Erstellung eines Intron Testsystems	35
3.2.2.2	Nachweis der Nutzung von Spleißakzeptorstellen der 3A-Site	37
3.3	Untersuchungen zur Transposition von <i>GTDs</i> in Gerste	41
3.3.1	Identifizierung von Pflanzen mit <i>GTDs</i> und Ac-TPase Konstrukten	41
3.3.2	Exzission von <i>GTDs</i>	42
3.3.3	Transposition von <i>GTDs</i>	43
3.3.4	Transpositionsnachweis mittels GUS-Expressions-Analysen	46
3.3.4.1	Theoretische Vorüberlegungen zum Transpositionsnachweis mittels GUS-Expressionsanalysen	48
3.3.4.2	GUS-Expressionsanalysen in “F3 Keimlingen”	50
4	Diskussion	53
4.1	Optimierung der <i>cis</i> -aktiven Spleißsignale in <i>GTDs B</i>	53
4.1.1	Die Spleißakzeptorstelle “A1” wird in <i>GTDs</i> präferentiell aktiviert	55
4.1.2	Die 3A-Site von <i>GTDs B</i> wird stringenter erkannt als die 3A-Site von <i>GTDs A</i>	58
4.1.3	<i>GTDs B</i> führt zur effizienteren Identifizierung von “GUS Phänotypen” in Getreiden	61
4.2	Transposition von <i>GTDs</i>	63
4.2.1	<i>GTDs</i> kann in Gerste von Ac-TPase <i>trans</i> -aktiviert werden	63
4.2.2	Die Expression des <i>GTDs</i> Reportergens in Keimlingen gibt Hinweise auf eine Transposition	66
4.3	Ausblick	67
5	Zusammenfassung	70
6	Literatur	72

1 Einleitung

Die Gene eines Organismus bilden die Grundlage für seine Eigenschaften. Daher ist die Identifizierung von Genen, ihrer Funktion und Regulation der Schlüssel zum Verständnis der Eigenschaften dieses Organismus. Ist die Funktion von Genen bekannt, so werden darauf aufbauend gezielte Veränderungen der Eigenschaften möglich. Dabei können Nutzpflanzen etwa widerstandsfähiger gegen biotischen und abiotischen Stress gemacht oder die Menge und Qualität des Erntegutes verbessert werden (Dunwell 2000). Ebenso können sich daraus neue Möglichkeiten für die Züchtung ergeben (Morgante und Salamini 2003). Bei einer geschätzten Zahl von 32000 bis 50000 Genen in Reis (*Oryza sativa* L. *ssp. japonica*), für den eine zu 93% komplette Sequenz des Genoms vorliegt (Goff et al. 2002), ist die Analyse der Funktion sämtlicher Gene eine umfangreiche Aufgabe, bei der möglichst effektive Werkzeuge die Arbeit erleichtern und beschleunigen sollen.

Ein möglicher Ansatz zur Isolierung von Genen und zur Bestimmung der Funktion von Genprodukten ist die Erzeugung und Untersuchung von Mutanten. Um identifiziert werden zu können, muß die Mutation zu einem detektierbaren Phänotyp führen. Für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird geschätzt, dass 60-70% der Gene nach einer Transposon Insertion keinen mutanten Phänotyp zeigen (Goebel und Petes 1986; Oliver et al. 1992; Burns et al. 1994). Eine systematische Analyse von knock-out Mutanten in Hefe hat ebenfalls zu der Erkenntnis geführt, dass ein signifikanter Teil von Mutationen zu keinem sichtbaren Phänotyp führt (Ross-Macdonald 2000). Besonders schwierig ist die Identifizierung von funktional redundanten Genen und von Genen, deren Produkte in mehreren Entwicklungsstadien benötigt werden. Damit eine Mutation in redundanten Genen zu einem Phänotyp führt, muß diese Mutation gleichzeitig in allen Kopien des Gens erfolgen. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich und damit selten. Daher bleiben diese Mutationen zumeist unentdeckt. Eine Mutation von Genen, deren Produkte eine Rolle in verschiedenen Stadien der Entwicklung spielen, ist häufig letal für den Organismus oder führt zu sehr komplexen Phänotypen, die eine experimentelle Untersuchung erschweren können.

Neben den bekannten Ansätzen zur Mutagenese über ein "gene silencing" mit Hilfe von *antisense* RNA oder RNA *interference* (Baulcombe 1996; Kumar und Carmichael 1998; Matzke et al. 1998; Waterhouse et al. 2001; Wang und Waterhouse 2002) sowie chemische- oder Strahlungsmutagenese und Insertionsmutagenese über Transposons (zur Übersicht Gierl und Saedler (1992) und Maes et al. (1999)), die alle die beschriebenen Nachteile aufweisen, wurden in den letzten Jahren verschiedene Technologien entwickelt, welche die Detektion der oben genannten Genklassen signifikant verbessern.

Alle diese Systeme basieren auf der zufälligen Integration von Reportergen-Konstrukten in das Wirtsgenom. Hierbei kann eine Identifizierung der Gensequenzen auf der Basis des Expressionsmusters in heterozygoten Organismen stattfinden, eine Mutation, die zu einem sichtbaren Phänotyp durch den Funktionsverlust des Gens führt, ist dabei nicht mehr notwendig.

Casadaban und Cohen (1979) beschrieben das erste System, bei dem dieses Prinzip angewen-

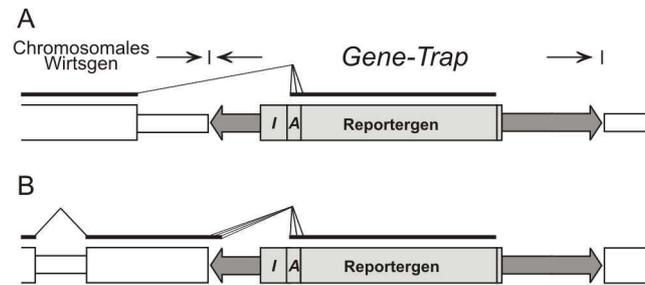


Abbildung 1: **Schematische Darstellung des *Gene-Trap* Ansatzes**

Das hier beispielhaft dargestellte *Gene-Trap* Element basiert auf dem *Ac*-Transposon aus Mais. Die Bildung verschiedener mRNA Spleißprodukte nach der Integration des *Gene-Trap* Elementes in ein genomisches Intron (A) oder Exon (B) ist dargestellt. Die durch schwarzen Linien verbundenen engen schwarzen Boxen im oberen Teil von Diagramm A und B zeigen die unterschiedlichen Spleißmöglichkeiten. Das *Gene-Trap* Element enthält ein Reporter-gen, upstream davon ein Intron (I) und eine künstliche dreifache Spleißakzeptorstelle (A). Die *Ac* Sequenzen an den 3' und 5' Enden sind als graue Pfeile abgebildet. Eine weite oder enge ungefüllte Box symbolisiert die Exon- und Intronsequenzen eines putativen chromosomalen Gens.

det wurde. Es basiert auf einem promotorlosen *lac*-Operon, das mit Hilfe des Bakteriophagen *Mu* zufallsmäßig in das *Escherichia coli* Chromosom integriert wurde. Die Aktivierung des *lacZ*-Reporter-gens ist abhängig von der Integration des Phagens in der richtigen Orientierung downstream von einem bakteriellen Promotor. Ist der Phage downstream eines konstitutiv exprimierenden Promotors integriert, so kann eine konstitutive *lacZ*-Expression beobachtet werden. Bei einer Integration in regulierte Gene kann die Aktivität des Reporter-gens zum Beispiel transient beobachtet werden oder unter bestimmten Bedingungen induziert werden. Inzwischen finden verschiedene Reporter-gen-Konstrukte, die z.T. auf modifizierten Transposons beruhen, sehr erfolgreich in Studien zur Entwicklung von Säugetieren (zur Übersicht Ceconi und Meyer (2000)) und *Drosophila* (zur Übersicht Bellen (1999)) Verwendung.

Diese Reporter-gen-Konstrukte verfügen über ein Reporter-gen, dessen Expression von der Transkription des chromosomalen Gens abhängt, in welches das Konstrukt integriert ist. Für verschiedene Ansätze wurden Systeme entwickelt, die sich unter anderem in den Reporter-gen-Konstrukten unterscheiden. Dabei wird der Begriff "*Gene-Trap*" als Oberbegriff zur Bezeichnung von *Enhancer-Trap*, *Promoter-Trap* und *Gene-Trap* Systemen verwendet.

Zur Identifikation von Enhancern dienen *Enhancer-Trap* Elemente (O'Kane und Gehring 1987; Bellen et al. 1989; Bier et al. 1989; Wilson et al. 1989). Ein *Enhancer-Trap* Element enthält ein Reporter-gen mit einem upstream vor dem Gen gelegenen Minimalpromotor. Gelangt das Element in den Wirkungsbereich eines Enhancers, so wird die Aktivität des Minimalpromotors verstärkt, dies kann zur Bildung einer nachweisbaren Menge des Reporter-enzym führen. *Promoter-Trap* Elemente wurden zur Identifizierung von Promotoren entwickelt (Friedrich und Soriano 1991). Ein *Promoter-Trap* Element enthält ein Reporter-gen ohne Promotor, welches bei Insertion in ein transkribiertes Gen ein funktionales Enzym bildet.

In einem *Gene-Trap* Konstrukt werden eine oder mehrere Spleißakzeptorsequenzen und manchmal auch eine Intronsequenz mit den in *cis*-wirkenden DNA Strukturelementen, die zur Erkennung und Nutzung der Spleißakzeptorstellen notwendig sind, upstream vor die kodierende Sequenz eines Reportergens gesetzt. Bei Integration des Konstruktes in ein Intron oder Exon eines chromosomalen Wirtsgens, entsteht ein Fusionsprotein aus dem “getaggtten” Genprodukt und dem Reportergen (Abbildung 1).

Damit es zu einer solchen Fusion kommt, besitzt das *Gene-Trap* Element spezielle Konstruktionsmerkmale. Upstream des promotorlosen Reportergens befindet sich eine dreifache Spleißakzeptorsequenz (3A-Site), die so konstruiert ist, dass eine transkriptionale Fusion des Reportergens in jedem der drei möglichen Leserahmen des “getaggtten” Wirtsgens erfolgen kann. Dadurch wird das Fusionstranskript zwischen dem “getaggtten” Gen und dem Reportergen so prozessiert, dass ein funktionales Reporterenzym translatiert werden kann. Theoretisch ist dies bei einem Drittel der prozessierten Transkripte möglich. Diese resultiert daraus, dass in der Zelle eine Population an Fusionstranskripten entsteht, bei denen die Sequenzen des *Gene-Trap* Konstruktes wie ein artifizielles Introns über die Nutzung der A1, A2 oder A3 Spleißakzeptorsequenz prozessiert werden. Nur die Nutzung einer der drei möglichen Spleißakzeptorsequenzen führt zu einem Template, von dem ein funktionaler Reporter translatiert werden kann. Wird diese Spleißakzeptorsequenz weniger häufig oder gar nicht benutzt, sinkt die Rate, mit der “getaggtte” Gene identifiziert werden können. Weitere wichtige Elemente im 5' Bereich des Reportergens sind eine Intronsequenz, welche die Verzweigungsstelle und die optimale DNA-Sequenzumgebung für ein effektives Spleißen liefert, sowie eine Spleißdonorsequenz (Abbildung 1). Der Einsatz einer Intronssequenz und drei Spleißakzeptorstellen upstream des Reportergens erhöht die Zahl der nachweisbaren Integrationen. Eine Studie in Reis (Jeon et al. 2000) hatte zum Ergebnis, dass die Effizienz mit der GUS-Expression bei transgenen Linien mit drei putativen Spleißdonorstellen, einem Intron und drei Akzeptorstellen gefolgt von dem GUS-Reportergen nachgewiesen werden kann, im Vergleich zu Linien ohne einem Intron und den Spleißstellen vor dem GUS-Gen, verdoppelt wurde. In *Arabidopsis* stellten Nussaume et al. (1995) eine Steigerung von 4 % in einem System ohne Intron nach Bechtold et al. (1993) auf 20% bei einem System mit Intron und 3A-Site und somit eine Verfünfachung fest.

Die Effektivität eines *Gene-Trap* Systems hängt wesentlich davon ab, dass das Element korrekt gespleißt wird. Als Spleißen bezeichnet man den Prozess, bei dem die Intronsequenzen aus der Precursor-mRNA (pre-mRNA) ausgeschnitten und die Exons dadurch fusioniert werden. Dieser Schritt ist von fundamentaler Bedeutung für die Genexpression. Eine Übersicht über die Spleißvorgänge in höheren Pflanzen geben Simpson und Filipowicz (1996). Das Spleißen der pre-mRNA findet in einem großen Ribonukleoprotein-Komplex, dem Spleißosom, statt. Der Spleißvorgang erfolgt schrittweise. Gesteuert wird er von zahlreichen in *cis*-wirkenden Elementen auf der mRNA. Generell wird angenommen, dass das Auffinden der Spleißakzeptorsequenz im Spleißprozess durch eine Art “*scanning*” Mechanismus bewerkstelligt wird, der präferentiell die erste Spleißakzeptorsequenz downstream der Verzweigungsstelle benutzt. Das Spleißen von pre-mRNA in höheren Pflanzen unterscheidet sich in einigen Punkten vom den

Spleißvorgängen in Säugetieren und Hefe. Heterologe Introns aus Vertebraten oder Hefe werden in transformierten Pflanzen in der Regel nicht oder nur sehr ineffizient herausgespleißt. Auch zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen bestehen Unterschiede. So werden Introns aus dikotylen Pflanzen in monokotylen Pflanzen korrekt und effizient prozessiert. Umgekehrt erfolgt die Prozessierung jedoch ineffizient oder überhaupt nicht.

Die Übergänge zwischen Exon und Intron sind stark konserviert. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Erkennen der Exon/Intron Grenze durch das Spleißosom. Die 5' Spleißdonorstelle hat in allen Eukaryoten meistens die Sequenz AG/GT (Simpson und Filipowicz 1996). Die im Intron downstream folgenden Basen AAGT sind ebenfalls relativ stark konserviert, jedoch nicht so stark wie der Exon/Intron Übergang AG/GT. Bei der 3' Spleißakzeptorstelle sind die Basen vor der Intron/Exon Grenze nicht ganz so stark, die Grenze selbst (AG/GT) ist jedoch stark konserviert, wobei in Vertebraten das T nicht konserviert ist. Eine möglichst gute Übereinstimmung mit den Konsensussequenzen ist für ein effizientes Erkennen und Spleißen erforderlich.

Die Verzweigungsstelle, welche in pflanzlichen Introns durchschnittlich 27 bp upstream der Spleißakzeptorstelle liegt, ist für den Spleißvorgang ebenfalls von großer Bedeutung. Sie ist für die Ausbildung der Lariatstruktur unbedingt erforderlich, ohne die das Spleißen nicht stattfinden kann. Im Gegensatz zu Hefe, wo die Sequenz der Verzweigungsstelle mit TACTAAC sehr stark konserviert ist, wurde für Pflanzen die degenerierte Konsensussequenz CTRAY ermittelt, wobei auch weiter degenerierte Sequenzen noch ein Spleißen ermöglichen (Simpson und Filipowicz 1996). Jedoch hat die Übereinstimmung mit dem Konsensus einen großen Einfluß auf die Definition der 3' Spleißakzeptorstelle (Simpson et al. 2002).

In Vertebraten beeinflusst ein Polypyrimidintrakt (T-Stretch) downstream der Verzweigungsstelle die Auswahl der Spleißakzeptorstelle. Auch pflanzliche Introns enthalten AU reiche Elemente, die hier eine wichtige Rolle bei der Introndefinition spielen. Dabei wurde zum Einen eine positionsunabhängige Wirkung AU reicher Elemente festgestellt (Baynton et al. 1996; Lorkovic et al. 2000; Brown et al. 2002), die eine Erkennung der Intronsequenz durch das Spleißosom positiv beeinflussen. Zum Anderen gibt es auch Hinweise darauf, dass ein T-Stretch in Pflanzen existiert und wie bei Vertebraten einen Einfluß auf die Auswahl der Spleißakzeptorstelle ausübt (Simpson et al. 2002).

Ein *Gene-Trap* Element kann auf einem Transposon basieren, um die Integration in neue genomische Positionen zu ermöglichen. Eukaryotische Transposons werden nach ihrem Transpositionsmechanismus und ihrer Vermehrung in zwei Gruppen unterteilt: Retrotransposons (Klasse I Elemente) und DNA Transposons (Transponierbare Elemente, Klasse II Elemente) (zur Übersicht Kunze et al. (1997)). Retrotransposons transponieren über eine RNA Zwischenform, bei DNA Transposons erfolgt die Transposition über ein Ausschneiden und Reintegrieren ("cut-and-paste"). Das Donor Element wird dabei physisch ausgeschnitten und an einer neuen Position im Genom reintegriert. Bei diesem Vorgang bleibt die Anzahl der Elemente im Genom in der Regel konstant. Die DNA Transposons werden in Überfamilien unterteilt, welche

Ähnlichkeiten in der DNA- und Proteinsequenz besitzen. Transposons kommen als autonome und nicht-autonome Elemente vor. Die autonomen Elemente besitzen alle Voraussetzungen, um transponieren zu können. Sie enthalten sowohl Sequenzen für die mobilisierenden *trans*-aktiven Proteine als auch Sequenzen, die in *cis* für die Transposition benötigt werden. Die *cis* wirkenden Sequenzen liegen an den Enden des Transposons und lassen sich in die “terminal inverted repeats” (TIRs) direkt an den Enden des Transposons und weitere Sequenzmotive in den subterminalen Regionen differenzieren. Für eine Transposition ist die Erkennung der *cis*-aktiven Sequenzen durch die *trans*-aktiven Proteine (Transposasen) notwendig. Die Veränderung weniger Basen oder aber eine partielle Deletion der TIR-Sequenz reicht aus, um das Transposon zu immobilisieren. Nicht-autonome Elemente können nicht alle der *trans*-aktiven Proteine bilden und transponieren nur dann, wenn diese Proteine von einem an einer anderen Stelle im Genom vorkommenden Element geliefert werden. Zusätzlich kommen defekte Abkömmlinge beider Klassen von Elementen vor, die aufgrund mutierter *cis* wirkender Sequenzen nicht mehr transponieren können. Basierend auf der Feinstruktur der TIRs und Homologien unter den Transposase Proteinen können die meisten pflanzlichen Transposons in zwei Überfamilien eingeordnet werden, und zwar die *Ac*-Überfamilie und die *En/Spm* oder *CACTA*-Überfamilie. In Pflanzen können mehrere unabhängige Familien coexistieren.

Bei der Transposition produzieren alle Transposons kurze Verdoppelungen der Zielsequenz (Target Site Duplication (TSD)). Die Exzision der Elemente kann zu charakteristischen Veränderungen in den TSDs führen, diese umfassen Deletionen, Additionen oder Basenkonversionen (Sutton et al. 1984; Fedoroff 1989; Baran et al. 1992; Scott et al. 1996). Diese Veränderungen werden als “Footprints” bezeichnet.

Eines der am besten charakterisierten Transposons ist das Activator/Dissociation (*Ac/Ds*) Element aus Mais. Das autonome *Ac*-Element hat eine Länge von 4565 bp und kodiert eine Transposase (*Ac*-TPase). Die *Ac*-TPase besteht aus 807 Aminosäuren. Es gibt ein modifiziertes Transposase Gen (*AcΔ102*), bei dem die ersten 102 Aminosäuren des Proteins deletiert sind. Diese Deletion führt beispielsweise in Petunienprotoplasten (Houba-Herlin et al. 1990) und transgenem Tabak (Kunze et al. 1995) zu einer erhöhten Transpositionsfrequenz von nicht-autonomen Elementen. Die für eine Erkennung durch die *Ac*-TPase notwendigen TIRs sind 11 bp lang (Pohlman et al. 1984; Coupland et al. 1989). Healy et al. (1993) konnten zeigen, dass eine Deletion der äußeren fünf Basen des 5'-TIR zur Stabilisierung des autonomen *Ac*-Elements in Tomate führt. Für eine Transposition werden neben den TIRs mindestens 238 bp der subterminalen 5' Region und 209 bp der subterminalen 3' Region benötigt (Coupland et al. 1989). Bei Insertion entsteht eine TSD von 8 bp. Die Dissociation-Elemente (*Ds*) gehören zur gleichen Familie. Ein *Ds*-Element ist nicht-autonom, es kann keine *Ac*-TPase bilden. Es springt nur in Gegenwart von *Ac* oder einem defekten *Ac*-Element, welches *Ac*-TPase bilden kann (zur Übersicht Kunze et al. (1997)).

Das *Ac*-Element wird sehr erfolgreich zur Insertionsmutagenese im Mais eingesetzt. Auch in verschiedenen heterologen Systemen wie z.B. Tabak, *Arabidopsis thaliana*, Tomate und Flachs findet *Ac* Verwendung (zur Übersicht Kunze et al. (1997)). Eine Transposition des

Ac-Transposons in Getreide wurde 1991 erstmals für Reis (*Oryza sativa* L.) gezeigt (Izawa et al. 1991). Dadurch wurde die Entwicklung verschiedener Systeme zur Insertionsmutagenese möglich (Enoki et al. 1999; Chin et al. 1999; Greco et al. 2001). Auch in der Wirtspflanze Gerste konnte die Transposition von autonomen *Ac*-Elementen von Scholz et al. (2001) und von nicht-autonomen *Ds*-Elementen durch Koprek et al. (2000, 2001) demonstriert werden.

Zur Insertionsmutagenese werden häufig so genannte Zwei-Komponenten Systeme eingesetzt. Ein Zwei-Komponenten System besteht aus einer Transposase-exprimierenden und einer Transposase abhängigen Komponente (nicht autonomes Element). Ziel eines solchen Systems ist die Möglichkeit, das nicht-autonome Element nach einer Transposition an seiner neuen genomischen Position stabilisieren zu können. In der Praxis enthält eine Pflanzenlinie ein Transposon, welches durch Entfernung der terminalen Transposase-Erkennungssequenzen nicht mehr transponieren kann, aber Transposase produziert. Die weitere Linie besitzt ein nicht-autonomes Element, welches von der Transposase *trans*-aktiviert werden kann. Durch Kreuzung jeweils einer Pflanzenlinie mit Transposase-Aktivität und einer Linie mit einem nicht-autonomen Element kommen Transposase und nicht-autonomes Element in den Zellen der Nachkommenlinie zusammen. Es besteht nun die Möglichkeit der Transposition und somit der Entstehung von Insertionsmutanten. In der folgenden Generation lässt sich das Transposasegen durch Segregation aus dem genomischen Hintergrund entfernen, und das nicht-autonome Element und die von ihm erzeugte Mutation sind stabil (Abbildung 2).

Zur Aufklärung von Genfunktionen ist der Einsatz von Transposon-induzierter Mutagenese ein bewährtes Verfahren (zur Übersicht Gierl und Saedler (1992)). Eine Möglichkeit bietet der Zugang über einen so genannten “*reverse genetics*” Ansatz. Dabei werden Transposonhaltige Populationen für die genetische Definition der Genfunktion, ausgehend von beliebigen DNA-Sequenzen, verwendet (zur Übersicht Maes et al. (1999)). Dafür wurden in den vergangenen Jahren eine Reihe von Methoden entwickelt, die die effiziente Identifizierung von Transposon-induzierten Mutanten ermöglichen. Als ein Beispiel sei hier das von Steiner-Lange et al. (2001) für *Arabidopsis* beschriebene Array-System angeführt. Dabei wird eine große Anzahl von Transposon-flankierenden Sequenzen isoliert und auf Filter aufgebracht. Eine Hybridisierung dieser Filter mit genspezifischen Sonden führt nun direkt zu den Pflanzen, die eine Transposon-Insertion in dem Ziel Gen enthalten. Einen anderen Ansatz nutzt die “*forward genetics*” Strategie. Dabei wird eine Transposon-induzierte Mutante identifiziert, ausgehend von der bekannten Transposonsequenz kann dann die Klonierung der Transposon-flankierenden Gensequenzen erfolgen. Basis für die endgültige Aufklärung der Genfunktion bleibt aber nach wie vor der Phänotyp der Mutante. *Gene-Trap* Systeme zeigen ihre Vorteile besonders beim Einsatz in “*forward genetics*” Ansätzen, die Transposon-induzierte Mutante kann dort über die Expression des Reportergens identifiziert werden.

Untersuchungen mit einem *Gene-Trap* System in *Arabidopsis* (Sundaresan et al. 1995) demonstrieren, welche Möglichkeiten eine solche Strategie für die Pflanzenforschung bietet. Das von Sundaresan et al. (1995) eingesetzte System basiert auf dem *Ac*-Transposon aus Mais, upstream vor dem GUS-Reportergen befindet sich die Sequenz des vierten Introns des *GPA1*

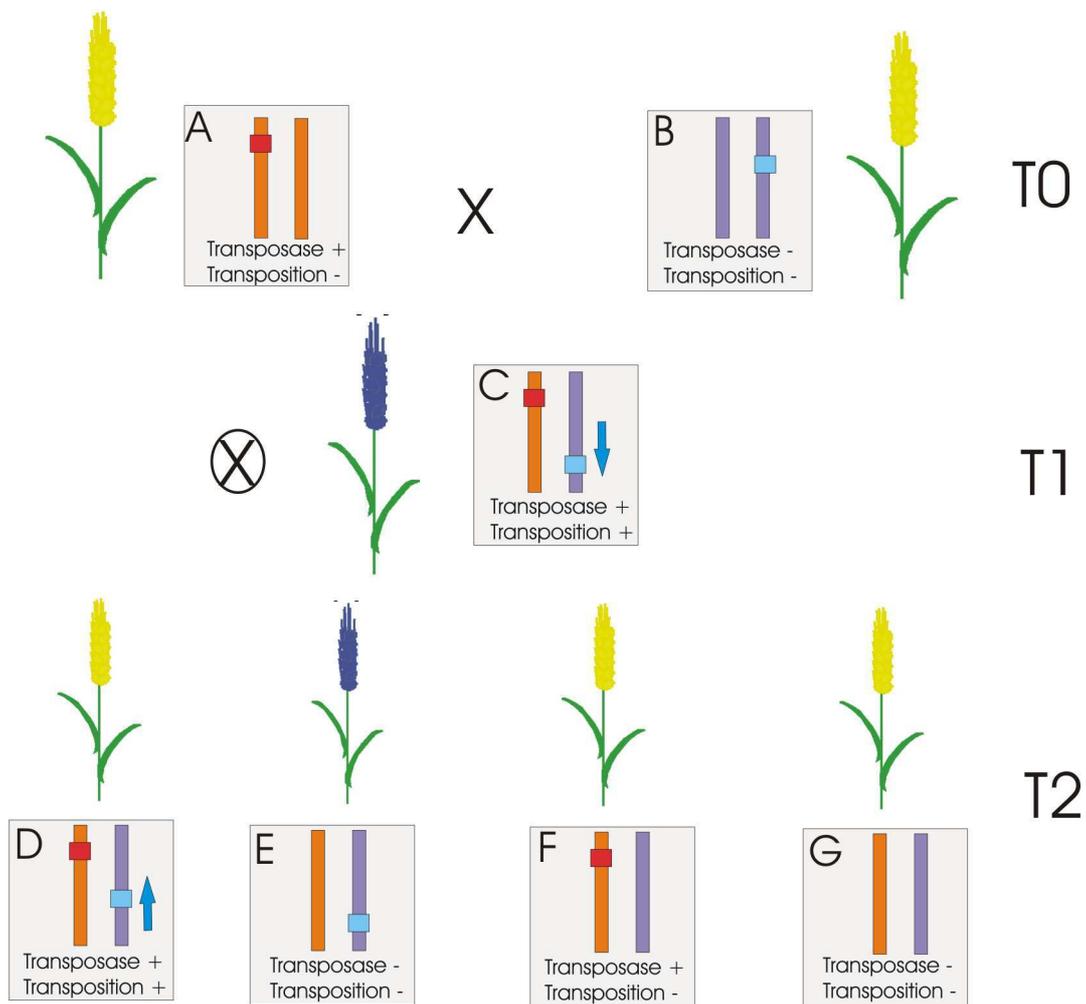


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Zwei Komponenten *Gene-Trap* Systems

Schematisch dargestellt sind drei Generationen, T0 bis T2 (Abbildung modifiziert nach Scholz (2000)). In der grauen Box neben den Pflanzen sind die Chromosomen als lange Kästen dargestellt, die kleinen Boxen stehen für das Transposasegen (rot) und *Gene-Trap* Element (blau). Der blaue Pfeil deutet Transpositionen des *Gene-Trap* Elementes an. A: Die aktivierende Komponente des Systems exprimiert die Transposase. B: Die nicht autonome-Komponente des Systems mit einer *Gene-Trap* Integration, welches sich von der Transposase aus Linie A *trans*-aktivieren lassen kann. C: Kreuzung von Linie A und B. Die Transposase *trans*-aktiviert das *Gene-Trap* Element. Eine durch Transposition in ein exprimiertes Gen verursachte Reportergen-Expression ist durch Blaufärbung der Ähre angedeutet. Die Pflanzen werden geselbstet und segregieren. D: Revertierung der Reportergen-Expression durch weitere Transposition des *Gene-Trap* Elementes. E: Das nicht autonome *Gene-Trap* Element ist stabil an seiner genomischen Position. F: wie A. G: Beide Komponenten sind durch Segregation verloren gegangen.

Gens aus *Arabidopsis* mit einer künstlichen 3A-Site, deren drei Spleißakzeptorstellen jeweils elf Basen Abstand zueinander besitzen (TGCAG/GTTATATGCAG/GTTATATGCAG/GT). Mehrere hundert Pflanzen mit unabhängigen *Gene-Trap* Integrationen wurden auf die Expression des verwendeten Reporters untersucht. Dabei hatte etwa ein Viertel der Integrationen der *Gene-Trap* Elemente eine Expression des Reporters zur Folge. Diese Expression trat in Blüten oder Keimlingen auf und zeigte eine organ-, gewebe-, zelltyp- oder entwicklungs-spezifische Expression. Diese so erhaltenen Expressionsmuster können zur Identifizierung von Genen führen, die eine Rolle bei der Organogenese und Zelldifferenzierung spielen (zur Übersicht Springer (2000)). Aus der ständig zunehmenden Zahl an Publikationen läßt sich ablesen, das diese *Arabidopsis Gene-Trap* Linien inzwischen ausgesprochen intensiv und erfolgreich genutzt werden. Das Gen *PROLIFERA* war das erste mit dem von Sundaresan et al. (1995) entwickelten *Gene-Trap* System identifizierte Gen in *Arabidopsis* (Springer et al. 1995). Dabei handelt es sich um ein Gen, dessen Mutation einen frühen letalen Phänotyp zeigt, und so mit konventionellen Mutagenesemethoden nicht zu identifizieren ist. Seitdem steigt die Zahl der identifizierten Gene stetig, so wurde seit dem Jahr 2001 die Identifizierung von Seneszenz-regulierenden Genen (He et al. 2001), einer monofunktionalen Aspartat Kinase (Yoshioka et al. 2001) und von einem RPS5-Gen (Weijers et al. 2001) beschrieben, dessen Mutation zu einer vollständigen Arretierung der Entwicklung in einem frühen embryonalen Stadium führt. Als weitere Beispiele zu nennen sind die Identifizierung eines RSH Gens, das für die normale Embryoentwicklung wichtig ist (Hall und Maura 2002), eines GH3-homologen Gens, das Mitglied einer Auxin-regulierten Genklasse ist (Tanaka et al. 2002), eines Mitglieds der RING-H2 Finger Protein-Familie, für das funktionale Redundanz nachgewiesen werden konnte (Lechner et al. 2002), einer Acyl-Hydrolase, die in Seneszenzprozessen eine Rolle spielt (He und Gan 2002), eines Gens mit Namen *POLARIS*, dessen Expression für das Wachstum von Wurzeln und die Ausbildung des vaskulären Blattsystems entscheidend ist (Casson et al. 2002), sowie einem Marker für die frühe Entwicklung des vaskulären Systems (Holding und Springer 2002).

Die Entwicklung weiterer *Gene-Trap* Systeme für Reis (Chin et al. 1999; Jeon et al. 2000) und das Moos *Physcomitrella patens* (Hiwatashi et al. 2001) wurde ebenfalls beschrieben. Das von Chin et al. (1999) eingesetzte System basiert auf dem *Ac*-Transposon aus Mais, upstream vor dem GUS-Reportergen befindet sich die Sequenz des dritten Introns des *Adh1* Gens aus Mais mit einer künstlichen 3A-Site nach Sundaresan et al. (1995). Das von Jeon et al. (2000) vorgestellte *Gene-Trap* System besitzt keine Transposon Sequenzen, die Mutagenese erfolgt über eine zufällige Integration des T-DNA Vektors. Upstream vor dem GUS-Reportergen befindet sich die Sequenz des dritten Introns des *OsTubA1* Gens aus Reis mit einer künstlichen 3A-Site nach Sundaresan et al. (1995) und am 5' Ende der Intronsequenz drei putative Spleißdonorstellen. Erste Untersuchungen zur Expression des Reportergens zeigen auch hier das Potential zur Identifizierung von interessanten und möglicherweise über andere Ansätze schwer zu untersuchenden Genen.

Ziel der Arbeitsgruppe ist es, ein aktives *Gene-Trap* System in Gerste zu etablieren, um die Vorteile eines solchen Systems für die Identifizierung von Genen nutzbar zu machen. Für Gerste

ist bisher noch kein *Gene-Trap* System publiziert worden, aufgrund der Unterschiede zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen scheint der Einsatz des von Sundaresan et al. (1995) für dikotyle Pflanzen entwickelten *Gene-Trap* Elementes in Gerste nicht geeignet zu sein.

Deshalb wurde bereits im Rahmen einer Diplomarbeit (Bergmann 2000) das für monokotyle Pflanzen optimierte *Gene-Trap* Element *GTDs A* entwickelt. Das Element basiert auf dem *Ac*-Transposon aus Mais, als Intronsequenz upstream des GUS-Reportergens wurde ein 145 bp Fragment des ersten Introns des *actin1* Gens aus Reis verwendet (McElroy et al. 1990). Der Abstand der Spleißakzeptorstellen der entwickelten 3A-Site (TG TAG/GTTTGCAG/-GTTTGCAG/GT) zueinander beträgt acht bp. Die bei der Untersuchung von *GTDs A* erhaltenen Ergebnisse, besonders die präferentielle Nutzung der 3A-Site Spleißstelle A1 (Bergmann 2000), zeigten das Potential für eine weitere Optimierung des *Gene-Trap* Elementes.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein *Gene-Trap* Element zu entwickeln, dessen Strukturelemente derart optimiert sind, dass sie ein effizientes Spleißen über alle drei Spleißakzeptorstellen in monokotylen Pflanzen erlauben.

Die Funktion des optimierten Elementes als nicht-autonome Teilkomponente in einem *Gene-Trap* System in Gerste wurde untersucht, sowie ein Vergleich der Funktion von *GTDs A* und dem optimierten Element durchgeführt. Dabei wurde insbesondere die Fähigkeit zur *trans*-Aktivierung und somit die Einsatzmöglichkeit in einem Zwei Komponenten System, sowie die effektive Erkennung und Benutzung aller drei Spleißakzeptorstellen der 3A-Site und daraus resultierend die Bildung eines funktionalen GUS-Reporterenzym analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Kits

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, im Reinheitsgrad pro analysis von den nachstehenden Firmen bezogen: Biometra (Göttingen), Biomol (Hamburg), Biorad (München), Boehringer (Mannheim), Difco (USA), Fluka (Schweiz), Hoechst (Frankfurt), Invitrogen (Karlsruhe), Life Technologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Schweden), Roth (Karlsruhe), Seakem (USA), Serva (Heidelberg) und Sigma (München). Die Herstellung der Lösungen erfolgte mit deionisiertem Wasser.

2.1.2 Kits und sonstiges Material

Goldpartikel: Biorad (München)

3 MM-Papier: Whatman (GB)

Nylon Membranen Hybond NX: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

HyperfilmMP: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

Reaktionsgefäße: Eppendorf (Hamburg)

TRIzol-Reagenz: Life Technologies (Eggenstein)

SuperScript One-Step RT-PCR System: Life Technologies (Eggenstein)

PolyATtract mRNA Isolation System IV: Promega (Mannheim)

TOPO TA Cloning Kit: Invitrogen (Groningen, NL)

Dig Taq DNA Sequencing Kit: Roche Diagnostic (Mannheim)

2.1.3 Geräte und Software

Gradientencycler Eppendorf Mastercycler: Eppendorf (Hamburg)

Particle Gun PDS-1000/He: Biorad (München)

Stratalinker UV Crosslinker: Stratagene (Heidelberg)

Analyse Softwarepaket DNASTAR Lasergene Vers. 4.00: DNASTAR Inc. (USA)

Spleißstellenvorhersage: Splice predictor (Brendel und Kleffe 1998)

2.1.3.1 Splice predictor

Die Software "Splice predictor" (Brendel und Kleffe 1998) bewertet die Wahrscheinlichkeit der Benutzung einer potentiellen Spleißstelle anhand von drei Parametern. Zum Einen wird der

Grad der Übereinstimmung mit den Konsensussequenzen (P) und zum Anderen die Sequenzumgebung (rho und gamma) bewertet. Je größer die Übereinstimmung einer Spleißstelle mit dem Konsensus ist, desto näher an 1 ist ihr P Wert ($0 \leq P \leq 1$). Der rho (R) Wert wird für jede Spleißstelle aus dem eigenen P Wert und dem P Wert ihrer potentiellen, besten Partner-Spleißstelle bestimmt. Der Wertebereich ist $0 \leq \rho \leq 1$. Der gamma (G) Wert schließlich gibt Aufschluß darüber, ob weitere Spleißstellen in der Sequenzumgebung in Konkurrenz zu der beurteilten Spleißstelle stehen. Je wahrscheinlicher die Nutzung anderer, benachbarter Spleißstellen ist, desto geringer ist der gamma Wert. Der Wertebereich ist $0 \leq \gamma \leq 2$. Zur schnellen Beurteilung wird aus allen drei Werten der * Wert gebildet, jeder der drei Einzelwerte für P, rho und gamma kann einen * Wert (P^* , R^* , G^*) zwischen 1 und 5 annehmen. Somit kann der gesamt * Wert ($P^*+R^*+G^*$) zwischen 3 (zweifelhaft) und 15 (sehr wahrscheinlich) liegen.

2.1.4 DNA-Sequenzanalysen

Die DNA-Sequenzanalysen wurden von den Firmen Seqlab (Göttingen) und "DNA Cloning Service" (Hamburg) durchgeführt. Für die Analyse der Sequenzen wurde die "DNASTAR" Software "Seqman" verwendet.

2.1.5 Enzyme

Alle verwendeten DNA-modifizierenden Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St.Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

2.1.6 Bakterienstämme

Zur Transformation und Amplifizierung von Plasmid-DNA wurden die folgenden Bakterienstämme eingesetzt:

TOP10F': Invitrogen (Groningen, NL) (Grant 1990)

Genotyp: F', lacIq, Tn10(TetR), mcrA, D(mrr-hsdRMS-mcrBC), f80lacZDM15, DlacX74, deoR, recA1, araD139, D(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL (StrR), endA1, nupG

DH5 α : Invitrogen (Groningen, NL)(Hanahan 1983)

Genotyp: F-, phi80dlacZDelta M15, Delta(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, hadR17(rk-,mk+), gal-, phoA, supE44, Lambda-, thi-1, gyrA96m, relA1

2.1.7 Pflanzenmaterial

Zur Gewinnung von Embryonen wurde die Sommergerste (*Hordeum vulgare* L.) kultivar "Golden Promise" verwendet.

Folgende transgene Gerstenlinien wurden eingesetzt:

GTDs A T0 Linien: 1, 2, 3, 4, 5; S. Lütticke (Universität Hamburg)

cwAcΔ102 Linien: cw2, cw3 und cw4; S. Lütticke (Universität Hamburg)

2.1.8 Plasmide

pAcΔ102 (A. Hoffmann und R. Kunze, nicht veröffentlicht)

Das Plasmid pAcΔ102 enthält eine modifizierte *Ac* Sequenz, die von kurzen Sequenzen aus der originalen Insertionsstelle im *wx-m7* Allel (Müller-Neumann et al. 1984) flankiert wird. Eine Deletion eines 412 bp Fragmentes (Position 988-1400 im wt *Ac*) resultiert in der Expression einer am N-Terminus um 102 Aminosäuren kürzeren Transposase. Zusätzlich wurden die letzten drei Basen der untranslatierten Leader Sequenz (Position 1405 bis 1408) zu ACC mutiert.

pCR2.1: Invitrogen (Groningen, NL)

pBluescript SK: Stratagene (Heidelberg) (Short et al. 1988)

pUbi.cas: (D. Becker, nicht veröffentlicht) pUC18 mit MCS zwischen einem Mais Ubiquitinpromotor (Christensen et al. 1992) (PMB18:675) und dem *nos*-Terminator aus *A. tumefaciens*.

pUbiGUS (K. Oldach, nicht veröffentlicht) Enthält das für eine bakterielle β -Glucuronidase kodierende GUS-Gen (*uidA*) (Jefferson 1987) in der MCS von pUbi.cas.

C1-sense: (V. Reddy, Universität Hamburg)

Das Plasmid enthält das *c1*-Gen aus Mais (Paz-Ares et al. 1986, 1987), flankiert vom *actin1* Promotor (McElroy et al. 1990) und dem *nos*-Terminator.

R1-sense: (V. Reddy, Universität Hamburg)

Das Plasmid enthält das *r1*-Gen aus Mais (Ludwig et al. 1989), flankiert vom *actin1* Promotor (McElroy et al. 1990) und dem *nos*-Terminator.

pGTDs A (Bergmann 2000)

pUbiGBSSI: Dieses Plasmid enthält das Weizen *gbs1* Gen zwischen einen Mais Ubiquitinpromotor (Christensen et al. 1992) (PMB18:675) und dem *nos*-Terminator von pUbi.cas. Das *gbs1* Fragment einer subklonierten genomischen Weizen DNA (cv. Florida) (Kluth et al. 2002), welches 1472 bp des 5' Endes der kodierenden Sequenz enthält, wurde in einer PCR mit einer "proof reading" Polymerase (Platinum Taq Pfx, Invitrogen) amplifiziert. Dieses genomische DNA Fragment enthält sechs Exon- und fünf Intron-Sequenzen, die in ihrer Größe jeweils zwischen 81 bp bis 330 bp und 75 bp bis 108 bp variieren. Der verwendete 5' Primer 11-8ATGPST (2.1.10) war dafür ausgelegt eine *PstI* Restriktionsschnittstelle vor das Translationsstart-Codon von *gbs1* einzufügen. Das PCR - Fragment wurde zuerst in einen pCR2.1 Vektor subkloniert und dann nachfolgend in die *PstI* und *SstI* Restriktionsschnittstellen von pUbi.cas.

2.1.9 Längenstandards

Lambda 16: Fermentas (St. Leon-Rot)

50 bp Ladder, 100 bp Ladder: Invitrogen (Karlsruhe)

Dig - markierter DNA Marker VII, Dig - markierter DNA Marker VIII: Roche (Mannheim)

2.1.10 Primer

Das Design der Primer erfolgte mit der "DNASTAR" Software PrimerSelect.

11-8ATGPST	5' TCTGCAGGTGCCATGGCGGCTCTGGTCAC 3'
GTRT2-3-dig	5' Digoxigenin-TTCACGGGTTGGGGTTTCTACAGG 3'
GTRT2-3	5' TTCACGGGTTGGGGTTTCTACAGG 3'
GTRT2-1	5' ATCTCCCCGCGCTACGACCAGT 3'
Reamp1	5' CAAGGACGCCTGGGACACC 3'
Reamp3	5' TGGGACACCAGCGTCATCTC 3'
Soe1	5' GACTGGCTGGATCTCGCAGA 3'
SoeM-L	5' GATGCAAAACCTTGGCCGTCGCTATA 3'
Soe4	5' ACATCCGAGAGCCCCATTC 3'
SoeM-U	5' GCATCTATAGCGACGGCCAAGGTTT 3'
GTSOE2-1	5' TGTA AAAACGACGGCCAGTGAA 3'
GTSOE2-2	5' CGCCATCTTGGACCTGCAACCTGCAACCTGCGTAAAAAAA- TTCAATTAGGAAAAGAAAAACTACCGATGAACA 3'
GTSOE2-3	5' CTAATTGAATTTTTTTTACGCAGGTTGCAGGTTGCAGGTCC- AAGATGGCGATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCA 3'
GTSOE2-4	5' CCACCACCTGCCAGTCAAC 3'
cw1	5' TGC GGTAAGGATCAACAACAC 3'
cw2	5' TTCAGCTCCAAAGACAAAGACAAC 3'
GTDS1	5' TTTCTTTCTTCTTTTTTGTGGGTAG 3'
GTDS2	5' CTTTGCCGTAATGAGTGACC 3'
pBR1	5' TCATCGTCATCCTCGGCACCGTCA 3'
pBR2	5' AAGAGCCGCGAGCGATCCTTGAAG 3'
hvwaxy1	5' AACGCGCCGCTAGCTCACCAGAT 3'
hvwaxy2	5' CAGCATA CGCCAGACCACCATTG 3'
GUS1	5' GCGTGGTGATGTGGAGTATTG 3'
GUS2	5' TCACCGAAGTTCATGGCAGTC 3'

Primer Synthese:

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Biometra (Göttingen) und Sigma (München) synthetisiert. Die Digoxigenin markierten Oligonukleotide wurden von der Firma Biometra (Göttingen) hergestellt.

pBR1 und pBR2 nach Scholz (2000).

hvwaxy1, hvwaxy2, GUS1, GUS2 nach S. Lütticke (Universität Hamburg).

2.1.11 Pflanzenmedien

Mikrosalze und Makrosalze nach Murashige und Skoog (1962).

2 x PL + 2,4 D Medium:

Makrosalze	200 ml
Mikrosalze	2 ml
Na-Fe-EDTA	4 ml
Prolin	2 ml
Thiamin HCl	1 ml
Myo Inositol	1 ml
Casein Hydrolysat	2 g
Maltose	60 g
H ₂ O	auf 1 l
2,4 D	2 mg/l
pH 5,7	

Aminosäure-Mischung (3AA):

Glutamin	750 mg/l
Prolin	150 mg/l
Asparagin	100 mg/l

2.1.12 Lösungen für die Histochemische GUS Färbung

X-Gluc Färbepuffer

Skutella	Keimlinge	
50 mM	10mM	Natrium Phosphat Puffer, pH 7,0
1 mM	1mM	EDTA
0,5 mM	-	Ferrocyanid
0,5 mM	-	Ferricyanid
0,1 %	0,1%	Triton X-100
	170mg/l	Chloramphenicol
		Lichtgeschützt bei -20 °C lagern

X-Gluc Ansatz

10 mg	X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure)
200 μ l	Ethylenglycolmonomethylether lösen
	und auf 10 ml X-Gluc Färbepuffer geben
	steril filtrieren

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden und die Herstellung allgemeiner Puffer und Medien wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Bei Verwendung von Kits und DNA modifizierenden Enzymen wurde, soweit es nicht anders angegeben ist, nach den Angaben der Hersteller verfahren.

2.2.2 Biolistischer Transfer von DNA in Gerstenzellen

(Becker et al. 1994)

Herstellung der Goldpartikel für die Transformation:

1. 40 mg Goldpartikel (2.1.2)(0,4-0,8 nm Durchmesser) werden in 1 ml Ethanol (abs, -20 °C) aufgenommen und durch Ultraschall-Behandlung suspendiert. Anschließend wird 10 sek bei 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Schritt 1 wird noch zweimal wiederholt, die Resuspendierung kann auch durch 1-2 min vortexen erfolgen.
2. Die Partikel werden in 1 ml Aqua bidest aufgenommen und durch 1 min vortexen resuspendiert. Anschließend wird 10 sek bei 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wird ebenfalls zweimal wiederholt.
3. 50 μ l Aliquots des Partikelansatzes werden in Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Fällen der Plasmide auf den Goldpartikelansatz:

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte sind auf Eis durchzuführen.

1. Zu einem 50 μ l Partikelaliquot werden 50 μ l CaCl₂ (2,5 M) und 20 μ l Spermidin (0,1 M) in den Deckel des Gefäßes gegeben. 10 μ l (1 μ g/ μ l) Plasmid-DNA wird bei schräg gehaltenem Gefäß an die Gefäßwand pipettiert. Es wird anschließend sofort 1-2 min gevortext.
2. Der Ansatz wird bei 10000 UpM 10 sek zentrifugiert und der Überstand entfernt.
3. Die Partikel werden in 250 μ l Ethanol (96 %, -20 °C) resuspendiert und bei 10000 UpM zentrifugiert.
4. Der Überstand wird entfernt und die Partikel in 80 μ l Ethanol (96 %, -20 °C) durch 1 min vortexen resuspendiert.
5. Für jeden Beschuss 3,5 μ l des gründlich gemischten Fällungsansatz verwenden.

2.2.3 Biolistische Transformation der Testerplasmide

Skutellumgewebe aus unreifen Gerstenembryonen cv. Golden Promise wurde aus oberflächensterilisierten Körnern präpariert und mit dem Skutellum nach oben auf Kallus Induktionsmedium (2.1.11) nach Scholz et al. (2001) gelegt. Dem Medium war 100 mg/l Cefotaxime zugesetzt, um einer bakteriellen Kontamination entgegenzuwirken. Biolistische Transformation über den Beschuss mit Mikroprojekten wurde einen Tag nach der Isolierung der unreifen Embryonen nach Becker et al. (1994) mit den folgenden Modifikationen durchgeführt. Auf die Goldpartikel wurde 10 μ g Plasmid gefällt und die Partikel wurden nach dem letzten Waschschrift in 80 μ l absolutem Ethanol resuspendiert (2.2.2).

3,5 μ l der Goldsuspension wurden für die Transformation bei einem Gasdruck von 7,6 mPa (1100 PSI) benutzt. Das beschossene Gewebe wurde für 36 Stunden bei 26 °C im Dunkeln inkubiert.

2.2.4 Southern-Blot Analyse

Nach Southern (1975). 12 μg restringierte genomische DNA wird auf einem 0,8% igen Agarsegel aufgetrennt und durch Kapillarkräfte auf eine Hybond NX Nylon Membran (2.1.2) transferiert. Nach dem Transfer für etwa 8 h wird die Membran getrocknet und die DNA wird mit UV-Licht im "Stratalinker" (2.1.3) mit 2500 $\mu\text{J}/100\text{ cm}^2$ fixiert. Der Nachweis von GUS spezifischer DNA erfolgte über eine Hybridisierung mit der DIG-markierten GUS-Sonde 1/2 (2.2.8) in einer Konzentration von 20-25 ng/ml Hybridisierungslösung nach Becker et al. (1994). Die Filter wurden bei Raumtemperatur auf Hyperfilm MP Röntgenfilme (2.1.2) exponiert.

2.2.5 Chemilumineszens DIG-Nachweisreaktion

Der chemilumineszens Nachweis von Digoxigenin erfolgte nach dem Handbuch "The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation" (Roche Diagnostics) mit folgenden Abweichungen: 30 min Inkubation in B2, 30 min Inkubation in B2 mit Dig-Antikörper (1:7500). 3 mal 15 min waschen mit WB, 5 min Inkubation in B3, 5 min Inkubation in B3 mit CSPD (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Die Filter wurden bei Raumtemperatur auf Hyperfilm MP Röntgenfilme (2.1.2) exponiert.

2.2.6 Histochemische GUS Färbung von Skutellumgewebe

Die Embryonen wurden in sterile Kulturschalen gegeben und mit dem GUS-Färbepuffer (2.1.12) überschichtet. Anschließend wurde üN bei 37 °C im Dunklen inkubiert.

Die erhaltenen Signale wurden unter dem Binokkular ausgezählt.

2.2.7 Histochemische GUS Färbung von Gerstenkeimlingen

Um die Umsetzung des X-Gluc Substrates durch bakterielle β -Glucuronidase zu verhindern, wurden alle Körner mit 1% Natriumhypochlorid 15 min oberflächensterilisiert und unter sterilen Bedingungen gekeimt. Die Keimung erfolgte in sterilen Petrischalen die mit sterilem Whatman Papier ausgelegt waren bei 26 °C im Dunklen. Es wurde 170 mg/ml Chloramphenicol in den GUS Färbepuffer gegeben (2.1.12). Die Färbung erfolgte 48h bei 37 °C im Dunklen. Zu Beginn wurde zwei mal eine Stunde eine Vakuuminkubation durchgeführt.

2.2.8 Herstellung einer GUS-Gen spezifischen Dig-markierten DNA-Sonde

Zur Herstellung der GUS-Gen spezifischen Digoxigenin markierten DNA Sonde GUS1/2 wurde folgende PCR-Reaktion eingesetzt:

50 μl Reaktionsvolumen. 100 ng pGTDs A (2.1.8), 2,5 U Taq, 1mM dNTP Mix, 0,09 mM Dig-11-dUTP, 2,5 mM MgCl_2 , 1 X PCR Puffer, 10 pmol der Primer GUS1 und GUS2 (2.1.10).

PCR-Programm: 96 °C 2'; [95 °C 45"; 60 °C 1'; 72 °C 2'] x 31; 72 °C 10'

2.2.9 “Footprint” PCR

Spezifische Fragmente “leerer” Donorstellen (“Footprints”) und des Gerste eigenen *waxy* Gens wurden in folgender PCR amplifiziert:

50 μ l Reaktionsvolumen, 1 μ l genomische DNA (300ng), 2,5 U Taq DNA Polymerase (MBI Fermentas), 1 X PCR Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 mM dNTP Mix, 2,5 mM MgCl_2 , 16 pmol der Primer pBR1 und pBR2, 4 pmol der Primer hvwaxy1 und hvwaxy2 (2.1.10).

PCR-Programm: 95°C 2'; [95°C 45"; 63°C 45"; 72°C 50"] x 34; 72°C 10'

2.2.10 Multiplex-PCR Nachweis von *GTDs* und *cwAc Δ 102*

Spezifische Fragmente für das *GTDs* Element, das *cwAc Δ 102* Konstrukt und das Gerste-eigene *waxy* Gen wurden in folgender PCR amplifiziert:

50 μ l Reaktionsvolumen. 1 μ l genomische DNA (300ng), 2,5 U Taq DNA Polymerase (MBI Fermentas), 1 X PCR Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM dNTP Mix, 2,5 mM MgCl_2 , 30 pmol der Primer cw1 und cw2, 10 pmol der Primer hvwaxy1 und hvwaxy2, 15 pmol der Primer GTDS1 und GTDS2 (2.1.10).

PCR-Programm: 96°C 2'; [95°C 45"; 58,5°C 45"; 72°C 50"] x 34; 72°C 10'

2.2.11 Sequenzreaktion

Die Herstellung der Dig-markierten Sequenzreaktion mit dem “Dig Taq DNA Sequencing Kit” (2.1.2) erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Es wurde 1pmol DNA mit dem Primer GTRT2-3-dig (2.1.10) eingesetzt.

PCR-Programm: [95°C 30"; 64°C 30"; 70°C 1'] x 29

2.2.12 Reamplifizierung membrangebundener DNA

Ein nach der Detektion entwickelter Röntgenfilm wurde als Schablone benutzt um die gewünschten Banden aus der Membran auszuschneiden, da die Banden auf der Membran selbst nicht sichtbar sind. Es wurden drei PCR Reaktionen durchgeführt.

PCR 1: 75 μ l Reaktionsvolumen mit dem einer spezifischen Bande entsprechenden Membranstück, 3,5 U Taq DNA Polymerase (MBI Fermentas), 35,7 pmol Reamp1 (2.1.10), 1 mM dNTP Mix, 2,5 mM MgCl_2 , 2,5 % Formamid und 1 X PCR Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

PCR-Programm: 95°C 2'; [95°C 45"; 60,5°C 45"; 72°C 50"] x 34; 72°C 10'

PCR 2: 75 μ l Reaktionsvolumen, 15 μ l aus der ersten PCR-Reaktion, 37,5 pmol der Primer Reamp1 und GTRT2-3 (2.1.10). Rest wie PCR1.

PCR-Programm: wie PCR 1

PCR 3: 50 μ l Reaktionsvolumen, 1 μ l Produkt PCR 2, 2,5 U Taq DNA Polymerase, 1,6 % Formamid, 25 pmol der Primer GTRT2-3 und Reamp3 (2.1.10).

PCR-Programm: 95°C 2'; [95°C 45"; 63°C 45"; 72°C 50"] x 34; 72°C 10'

2.2.13 SOE PCR Strategie für die *GTDs B* Klonierung

Zur Klonierung von *GTDs B* wurde *GTDs A* durch einen partiellen Verdau mit *BssHIII* aus den pBR322 Vektor (2.1.8) ausgeschnitten und mit Hilfe des Klenow Fragmentes wurden die 5' überhängenden Enden des Fragmentes aufgefüllt. Das Element wurde dann in einen mit *EcoRV* geschnittenen pBluescript Vektor (2.1.8) kloniert. Mit der PCR basierten SOE Methode (Horton et al. 1989) wurde die neue *GTDs B* Sequenz eingefügt (5' CTAATTGAATTTTTTTT-TACGCAGGTTGCAGGTTGCAGGTCCAAGATGGCG 3'). Die PCR Strategie ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Im ersten Schritt wurden zwei Segmente zwischen dem *actin1* Intron und dem GUS-Gen mit den Primern GTSOE2-1 und GTSOE2-2 (Reaktion 1, PCR 1) sowie GTSOE2-3 und GTSOE2-4 (Reaktion 1, PCR 2) amplifiziert. GTSOE2-2 und 2-3 enthielten dabei an ihrem 3' Ende jeweils die überlappenden, neuen Sequenzen. Die in der ersten Reaktion erhaltenen PCR-Fragmente wurden in der zweiten Reaktion für eine PCR mit den Primern GTSOE2-1 und 2-4 verwendet. Ein *BglII*/*MunI* Fragment der so erhaltenen rekombinanten DNA wurde dazu benutzt, das entsprechende Stück in *GTDsA* zu ersetzen.

Reaktion 1: 50 μ l Reaktionsvolumen. 200 ng *GTDs A* pBluescript DNA, 1 mM dNTPs, 1 X PCR Puffer (Invitrogen), 2,5 U Taq (Invitrogen), 2,5 mM MgCl₂, 50 pmol der Primer GTSOE2-1 und GTSOE 2-2 (PCR 1) bzw. GTSOE2-3 und GTSOE2-4 (PCR 2) (2.1.10).

PCR-Programm für PCR 1 und PCR 2: 96°C 2'; [96°C 45"; 55 °C 1'; 72°C 1'] x 24; 72°C 10'

Reaktion 2: 50 μ l Reaktionsvolumen. 200 ng PCR 1 und PCR 2 Amplifikat, 1 mM dNTPs, 1 X PCR Puffer (Invitrogen), 2,5 U Taq (Invitrogen), 2,5 mM MgCl₂, 50 pmol der Primer GTSOE2-1 und GTSOE2-4 (2.1.10).

PCR-Programm für PCR 3: 96°C 2'; [96°C 45"; 55 °C 1'; 72°C 90"] x 24; 72°C 10'

2.2.14 Klonierung der Exontester

GTDs A bzw. *GTDs B* wurden in das dritte Exon des Weizen *gbss1* Gens (Kluth et al. 2002) in das Basisplasmid pUbiGBSSI (2.1.8) kloniert. *GTDs A* und *B* wurden jeweils mit *ClaI* und *EcoRI* (2.1.5) aus dem pBluescript Vektor ausgeschnitten. Die durch die Restriktion 5' überhängenden Enden mit Hilfe des Klenow Fragmentes (2.1.5) aufgefüllt. pUbiGBSSI wurde mit *SalI* (2.1.5), restringiert, danach wurden mit dem Klenow Fragment (2.1.5) die Enden aufgefüllt und mit CIP (2.1.5) die Phosphatreste entfernt. Das jeweilige *GTDs* Fragment wurde in pUbiGBSSI ligiert.

2.2.15 RT-PCR Analyse von mRNA aus mit Exontester Konstrukten transformierten Skutella

Für die RT-PCR wurden 175 bis 769 ng mRNA eingesetzt. Das SuperScript One-Step RT-PCR System (2.1.2) wurde mit 20 pmol der Primer GTRT2-3-dig und GTRT2-1 (2.1.10) eingesetzt. Die reverse Transkription erfolgte eine Stunde bei 50 °C.

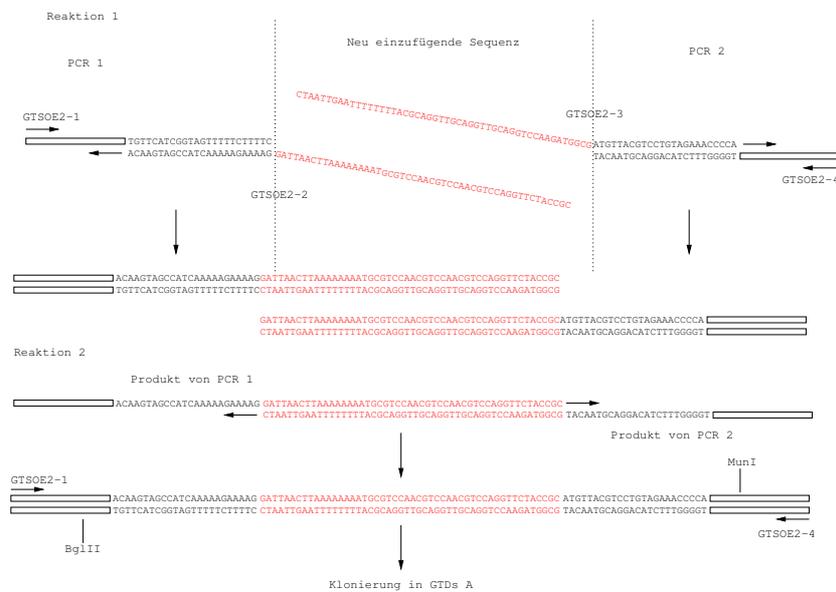


Abbildung 3: **Schematische Darstellung der Klonierung von *GTDs B***

Dargestellt sind die SOE PCR Reaktionen 1 (oben) und 2 (unten). Reaktion 1 findet in zwei Teilschritten statt, PCR 1 (links) und PCR 2 (rechts). Schwarz dargestellte Sequenzen sind mit den *GTDs A* Sequenzen identisch, rot dargestellte Sequenzen symbolisieren die entwickelten Änderungen. In das Produkt von Reaktion 2 sind die zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme eingezeichnet.

PCR-Programm: 50°C 60'; 94°C 2'; [94°C 55"; 65 °C 40"; 72°C 1'] x 19; 72°C 5'

2.2.16 Klonierung der Intronester Konstrukte

Leserahmenverschiebung +1 über eine SOE PCR Strategie:

Reaktion 1: 50 μ l Reaktionsvolumen. 2,5 mM MgSO₄, 1 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 25 pmol der Primern Soe1 und SoeM-L (PCR 1) bzw. Soe4 und SoeM-U (PCR 2) (2.1.10), 2,5 U Pfu Polymerase (MBI Fermentas), 1 x PCR Puffer und 1 ng der Plasmide GTDsA-Int bzw. GTDsB-Int.

PCR-Programm für PCR 1 und PCR 2: 96°C 2'; [95°C 45 " ; 58°C 1'; 72°C 80 "] x 31; 72°C 10'

Reaktion 2: 50 μ l Reaktionsvolumen. 200 ng Amplifikat aus PCR 1 und PCR 2, 2,5 mM MgSO₄, 1 mM dNTPs, 25 pmol Primer Soe1 und Soe4 (2.1.10), 2,5 U Pfu Polymerase (MBI Fermentas), 1 x PCR Puffer.

PCR-Programm: 96°C 2'; [95°C 45 " ; 58°C 1'; 72°C 80 "] x 31; 72°C 10'

Ein *PacI*/*SalI* Restriktionsfragment des rekombinanten PCR Produktes wurde in das entsprechende Plasmid, GTDs A-Int bzw. GTDs B-Int, kloniert und ersetzte die unveränderte Sequenz. Die resultierenden Plasmide wurden mit GTDsA-Int+1 und GTDsB-Int+1 bezeichnet.

Leserahmenverschiebung +2 über partielles Auffüllen der *SalI* Restriktionsschnittstelle:

Um den Leserahmen für die GUS Synthese um zwei Nukleotide zu verschieben, wurde die *SalI* Restriktionsschnittstelle (2.1.5) von GTDs A-Int und GTDs B-Int partiell, unter Verwendung der Nukleotide C, G und T, mit Hilfe des Klenow Fragments (2.1.5) aufgefüllt und der restliche 5' T-Überhang vor der Religation mit Hilfe von "MungBean" Nuklease (2.1.5) entfernt. Die erhaltenen Plasmide wurden GTDsA-Int+2 und GTDsB-Int+2 genannt.

2.2.17 PCR der Exon Referenzprodukte

50 μ l Reaktionsvolumen. 10 pg Template DNA (D1A1 und D3A1 cDNA Klone von *GTDs A* und *GTDs B*), 1 U Platinum Taq (Invitrogen), 1mM dNTP Mix, 2,5 mM MgCl₂, 1 X PCR Puffer, 25 pmol der Primer GTRT2-3-dig und GTRT2-1 (2.1.10).

PCR-Programm: 95 °C 2';[94 °C 45"; 65 °C 45"; 72 °C 50"] x 34; 72 °C 10'

3 Ergebnisse

Der Vorteil beim Einsatz eines *Gene-Trap* Systems liegt darin, dass eine Expression des *Gene-Trap* markierten Wirtsgens über eine Expression des Reportergens des *Gene-Trap* Elementes feststellbar ist. Somit entsteht ein zellspezifischer Marker für die Genexpression. Darüber hinaus sind weiterhin die Verwendung von so genannten “*forward genetics*” und “*reverse genetics*” Strategien möglich (zur Übersicht Maes et al. (1999)). Ziel dieser Arbeit war es, ein für monokotyle Pflanzen optimiertes *Gene-Trap* Element zu entwickeln, das nach Insertion in ein Gen mit hoher Frequenz zur Expression des Reporters führt, unabhängig davon, ob die Insertion in ein Exon oder Intron des Gen stattgefunden hat.

Zur Expression des Reporters muß eine Fusion zwischen dem Transkript des Wirtsgens und dem Transkript des Reportergens des *Gene-Trap* Elementes stattfinden. Durch den Spleißvorgang muß der Leserahmen zur Synthese des Reporters in dem gleichen Leserahmen gebracht werden, der zur Synthese des pflanzlichen Wirtsgenproduktes verwendet wird. Nur so kann eine C-terminale GUS Fusion an das Wirtsgenprodukt entstehen. Im *Gene-Trap* Element vorhandene *cis*-Elemente beeinflussen den Spleißvorgang. Dies sind zum einen vier Spleißdonorstellen (4D-Site) am 5' Ende des *Gene-Trap* Elementes, sowie der 3' Bereich eines Introns, und upstream des Reportergens drei künstliche Spleißakzeptorstellen (3A-Site). Die Sequenzen der Spleißstellen sollen so optimiert sein, dass eine möglichst gute Erkennung und Nutzung durch das Spleißosom erfolgt. Um das Produkt des Reportergens nachweisen zu können, muss seine Menge einen Schwellenwert überschreiten. Die Menge des gebildeten GUS Produktes ist von verschiedenen Faktoren abhängig, etwa von dem Expressionslevel des Wirtsgens und der Stabilität des Fusionstranskripts. Diese Faktoren können jedoch nicht beeinflusst werden. Daher soll durch die Bereitstellung einer möglichst großen Menge an korrekt gespleißter Wirtsgen:Reporter mRNA die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, dass der zum Nachweis notwendige Schwellenwert überschritten wird.

Um eine Insertion in ein Gen zu erhalten, muss das *Gene-Trap* Element seine Position im Genom verändern können. Dafür muss es von einer Transposase erkannt und *trans*-aktiviert werden. Dabei sollte die Transpositionsfrequenz bekannt sein, um die Größe der für eine Untersuchung benötigten Population berechnen zu können. Bei einer höheren Transpositionsfrequenz kann die Population entsprechend kleiner gewählt werden.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit gliedert sich somit in die Entwicklung des *Gene-Trap* Elementes, Untersuchungen zur Funktion der Spleißstellen und ihrem Umfeld, Untersuchungen zur Transposition des Elementes in Gerste und zur Expression des *Gene-Trap* Reporters nach einer Transposition.

3.1 Klonierung des Gene Trap Elementes *GTDs B*

Das hier klonierte *Gene-Trap* Element *GTDs B* (***Gene-Trap Ds***) basiert auf dem von Bergmann (2000) entwickelten *Gene-Trap* Element *GTDs A* (2.1.8). Es enthält die *cis*-wirksamen

Sequenzen des *Ac*-Transposons aus Mais, die für eine *trans*-Aktivierung durch die *Ac*-Transposase nötig sind (zur Übersicht Kunze et al. (1997)). Als Reportergen bietet sich das GUS-Gen (*uidA*) an, das für eine bakterielle β -Glucuronidase kodiert (Jefferson 1987). Das GUS-Enzym toleriert lange aminoternale Extensionen, was besonders in diesem Ansatz von Vorteil sein kann. Es hat eine relativ lange Halbwertszeit (Jefferson 1987), und ermöglicht so durch seine Anreicherung in den Zellen eine hohe Sensitivität. Außerdem stehen etablierte Verfahren zum histochemischen Nachweis der Enzymaktivität zur Verfügung. In *GTDs A* werden die strukturellen Elemente einer 3' Spleißstelle von einem 145 bp Fragment des ersten Introns des *actin1* Gens aus Reis verwendet (McElroy et al. 1990). Zwei zusätzliche Spleißakzeptorstellen wurden 3' dieser natürlichen Akzeptorstelle eingefügt, um die verbleibenden Leserahmen für die GUS Synthese abzudecken. Die Sequenzen dieser künstlichen Spleißstellen entsprechen dem Konsensus für monokotyle Pflanzen (-5)TGCAG/GT(+2) (Simpson und Filipowicz 1996) (Abbildung 5). Anders als die künstlichen Akzeptorstellen besitzt die Spleißstelle A1 ein T statt einem C an Position -3 am Intron/Exon Übergang, ist also nicht konform mit dem oben genannten Konsensus für 3' Spleißakzeptorstellen. In *GTDs A* liegen zwei putative Verzweigungsstellen an Position -11 (CGGAG) und -27 (CAAAT) upstream der A1 Spleißstelle der 3A-Site, beide entsprechen nicht dem Konsensus (Simpson und Filipowicz 1996). Downstream der Akzeptorstellen befindet sich das bakterielle GUS-Gen. Eine mögliche Effizienz der Spleißstellenerkennung in Transkripten monokotyler Pflanzen wurde mit der Internet Version des Programmes "Splice predictor" (Brendel und Kleffe 1998) berechnet. Erläuterungen zur Software und der Spleißstellenbewertung finden sich unter 2.1.3.1. Wie erwartet, werden die künstlichen Akzeptorstellen A2 und A3 als wahrscheinliche (*13 und *11) Spleißstellen eingestuft, während A1 als zweifelhaft (*4) eingestuft wird (Abbildung 4).

Erste transiente Untersuchungen zur Spleißstellenbenutzung über die Sequenzierung von Spleißprodukten in *GTDs A* (Bergmann 2000) gaben Hinweise auf eine nicht optimale Erkennung der Spleißakzeptorstellen.

3.1.1 Theoretische Überlegungen zur Entwicklung von *GTDs B*

Eine gleichmäßige Benutzung von A1, A2 und A3 hat den Vorteil, dass bei der Integration in Intron- oder Exonsequenzen des Wirtsgens in jedem Leserahmen funktionales GUS entsteht. In *GTDs B* wurden mehrere am Spleißprozeß beteiligte strukturelle Elemente modifiziert, mit dem Ziel, eine möglichst effektive Fusion des GUS-Gens mit dem Wirtsgen durch die Nutzung der Spleißstellen der 3A-Site zu erreichen, und damit auch eine Verbesserung gegenüber dem *GTDs A* Element zu erzielen.

Da sich die Verwendung der Spleißstelle A1 bei Tests mit *GTDs A* (Bergmann 2000) als predominant herausgestellt hat, sollte durch Veränderungen der 3A-Site eine effektivere Nutzung der Spleißstellen A2 und A3 erreicht werden. Alle Spleißstellen der 3A-Site sind hier künstlich, dabei weicht die Sequenz der ersten Spleißstelle A1 leicht vom Konsensus ab (Simpson und Filipowicz 1996). Nach dem für das Spleißen in Pflanzen postulierten "scanning" Mechanis-

GTDs A

	Typ	Sequenz	P	rho	gamma	*	P*R*G*
D1	D	acgGTcgggt	0.372	0.000	0.000	5	(3 1 1)
D2	D	tcgGTAacg	0.164	0.000	0.000	4	(2 1 1)
D3	D	acgGTcgggt	0.334	0.000	0.000	5	(3 1 1)
D4	D	tcgGTaa	0.456	0.000	0.000	5	(3 1 1)
D6	D	acgGTAatc	0.069	0.000	0.000	3	(1 1 1)
D7	D	ccgGTat	0.817	0.269	0.361	14	(5 5 4)
D8	D	tcgGTaaaa	0.151	0.009	0.000	5	(2 2 1)
	A	cttaattaacatAGat	0.057	0.001	0.000	3	(1 1 1)
	A	atctggagcacacAGat	0.422	0.056	0.000	7	(3 3 1)
	A	ttgtgacaaatgcAGcc	0.048	0.000	0.000	3	(1 1 1)
A1	A	ggagctttttgtAGgt	0.124	0.000	0.000	4	(2 1 1)
A2	A	ttttaggtttgcAGgt	0.951	0.284	0.110	13	(5 5 3)
	D	cagGTttgc	0.039	0.002	0.082	4	(1 1 2)
A3	A	tttgcaggtttgcAGgt	0.904	0.256	0.000	11	(5 5 1)

GTDs B

	Typ	Sequenz	P	rho	gamma	*	P*R*G*
D1	D	acgGTcgggt	0.421	0.000	0.000	5	(3 1 1)
D2	D	tcgGTAacg	0.193	0.000	0.000	4	(2 1 1)
D3	D	acgGTcgggt	0.421	0.000	0.000	5	(3 1 1)
D4	D	tcgGTaaaa	0.456	0.000	0.000	5	(3 1 1)
D6	D	acgGTAatc	0.069	0.000	0.000	3	(1 1 1)
D7	D	ccgGTat	0.817	0.264	0.361	14	(5 5 4)
D8	D	tcgGTaaaa	0.151	0.009	0.000	5	(2 2 1)
	A	cttaattaacatAGat	0.057	0.001	0.000	3	(1 1 1)
	A	atctggagcacacAGat	0.422	0.041	0.000	7	(3 3 1)
A1	A	attttttttacgcAGgt	1.000	0.231	0.003	12	(5 5 2)
A2	A	ttacgcaggtttgcAGgt	0.997	0.229	0.000	11	(5 5 1)
A3	A	ggttgcaggtttgcAGgt	0.993	0.227	0.000	11	(5 5 1)

Zusammenfassung:

P		rho		gamma		*		
A	B	A	B	A	B	A	B	
0.124	1.000	0.000	0.231	0.000	0.003	4	12	A1
0.951	0.997	0.284	0.229	0.110	0.000	13	11	A2
0.904	0.993	0.256	0.227	0.000	0.000	11	11	A3

Abbildung 4: Spleißstellenvorhersage für *GTDs A* und *B* mit Hilfe des Programmes “Splice predictor”

Im oberen Teil der Abbildung sind die berechneten Werte für *GTDs A* zusammengestellt, in der Mitte die Werte für *GTDs B*, und im unteren Teil findet sich eine Zusammenfassung der Werte beider Elemente für die drei Spleißakzeptorstellen A1, A2 und A3. Die putativen Donorstellen sind mit Dx bezeichnet, wobei x eine fortlaufende Nummerierung der Donorstellen nach ihrem Auftreten in Richtung 3' des Elementes, beginnend mit 1, darstellt (siehe auch Abbildung 6, Seite 28). Die von Sundaresan et al. (1995) postulierte Spleißstelle D5 wird von “Splice predictor” nicht vorhergesagt. Zu jeder Spleißstelle wird die Sequenz angegeben, sowie die Wahrscheinlichkeit ihrer Benutzung, aufgliedert in die drei Einzelbewertungen von “Splice predictor” (P, rho und gamma) und die Zusammenfassung der Bewertung (* und P*R*G* Wert) (2.1.3.1).

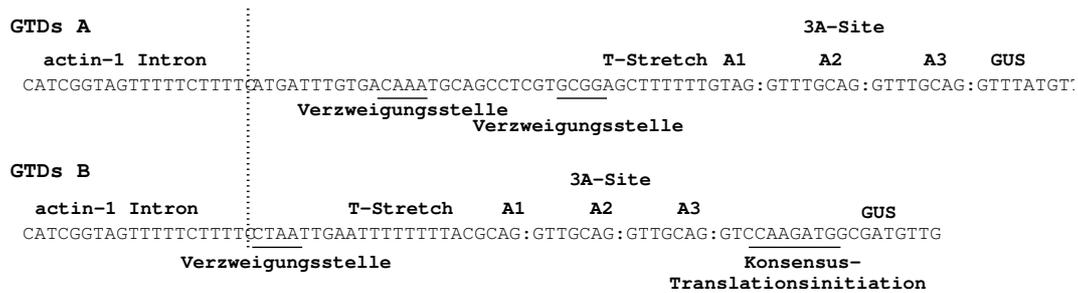


Abbildung 5: Schematische Darstellung der strukturell wichtigen Elemente von *GTDs*

Die Abbildung zeigt für *GTDs A* (oben) und *GTDs B* (unten) die strukturell wichtigen Elemente im Intron und der 3A-Site upstream des GUS-Gens der Elemente. In *GTDs A* gibt es zwei mögliche Verzweigungsstellen, die beim Spleißen aktiviert werden können, bei *GTDs B* sind diese durch nur eine, dem Konsensus entsprechende, ersetzt (Simpson et al. 1996). Ebenso ist der T-Stretch bei *GTDs B* verlängert, und der Abstand der Spleißstellen der 3A-Site, A1, A2 und A3 wurde von 8 bp auf 7 bp verringert. Die Umgebung der Translationsinitiation wurde bei *GTDs B* dem Konsensus angepasst (Joshi et al. 1997).

mus (Simpson und Filipowicz 1996) erfolgt die Selektion der Spleißakzeptorstelle, nachdem das Spleißosom die Verzweigungsstelle selektiert hat. Es werden nur Akzeptorstellen benutzt, die in einer definierten Entfernung dieser Verzweigungsstelle liegen (20-40 bp) (Lorkovic et al. 2000), und es wird präferentiell die der Verzweigungsstelle downstream am nächsten gelegene Akzeptorstelle selektiert. Alle drei Akzeptorstellen der 3A-Site müssen damit in der für Pflanzen ermittelten Entfernung von der Verzweigungsstelle liegen. Eine schematische Übersicht zeigt Abbildung 5. Bei *GTDs B* wird eine dem Konsensus entsprechende Verzweigungsstelle (CTRAY) verwendet (Simpson und Filipowicz 1996), und der Abstand der drei Spleißstellen zueinander auf sieben Basen verringert. Eine weitere Annäherung ist unter Verwendung der weiteren Konsensussequenzen (Simpson und Filipowicz 1996) und der zueinander versetzten Lage der drei Spleißstellen nicht möglich. Die Verwendung der weiteren Konsensussequenz, welche die Basen -3 bis -5 upstream des AG/ der Spleißstelle umfasst, ist notwendig, da diese einen Einfluß auf die Spleißstellenselektion hat (Simpson und Filipowicz 1996) und hier eine möglichst optimale Erkennung der Spleißstellen erreicht werden soll.

Um einen dem Konsensus für monokotyle Pflanzen entsprechenden Verzweigungsstelle (CTRAY) 20 bis 40 bp upstream des Akzeptor AG/ (Lorkovic et al. 2000) aller drei Spleißstellen zur Verfügung zu stellen, wurde eine künstliche Sequenz an die Position -42 des Reis *actin1* Introns mit einer speziellen PCR Technik eingefügt (2.2.13 und Abbildung 3). Dadurch wurden die zwei putativen Verzweigungsstellen an Position -11 und -27 durch eine der Konsensussequenz für pflanzliche Verzweigungsstellen entsprechenden Sequenz (CTAAT) in 20 bp, 27 bp and 34 bp Entfernung von A1, A2 und A3 ersetzt. Auch hier liegt die Translationsinitiationsstelle des GUS hinter drei künstlichen Akzeptorstellen, die resultierenden transkriptionalen Fusionen liegen so in drei verschiedenen Leserahmen. A2 und A3 entsprechen genau dem Konsensus monokotyler Pflanzen (Simpson und Filipowicz 1996), bei A1 wurde der Akzeptor Konsensus

von TTGCAG/ durch die Verwendung von AC an Position -5 und -6 marginal verändert. Durch Schwächung der Akzeptor Konsensussequenz sollte die präferentielle Nutzung von A1 verringert und eine verstärkte Nutzung von A2 und A3 erreicht werden.

Eine Prüfung der 3A-Site von *GTDs B* mit dem "Splice predictor" Programm (2.1.3.1) ergab eine Einstufung von A1, A2 und A3 als wahrscheinliche (*12,11,11) 3' Spleißstellen. Die Spleißstellenvorhersage zeigte auch, dass bei *GTDs A* eine Akzeptorstelle in Konkurrenz zu 3A-Site steht, diese liegt 23 bp upstream von A1. Für eine möglichst häufige Nutzung der 3A-Site sollten keine Akzeptorstellen in Konkurrenz zu ihr stehen. Daher wurde diese Spleißstelle in *GTDs B* entfernt. Das genaue Ergebnis der Überprüfung ist in Abbildung 4 dargestellt. Die ersetzte Sequenz wurde auch dazu genutzt, um ein weiteres wichtiges Strukturmerkmal zu optimieren. Nach Daten von Baynton et al. (1996), Lorkovic et al. (2000) und Brown et al. (2002) spielen U-reiche Sequenzen eine Rolle bei der Erkennung von 3' Spleißstellen und nach Simpson et al. (2002) verbessert ein T-Stretch die Spleißstellenerkennung. Daher wurde die "Stärke" des in *GTDs A* bereits vorhandenen Uridin Traktes erhöht, indem ein T-Stretch 6 bp upstream des 3' AG/ von 6 bp auf 8 bp verlängert wurde. Zusätzlich dazu wurde im Vergleich zu *GTDs A* die AUG Kontextsequenz des GUS-Gens optimiert, um der Konsensussequenz für die Translationsinitiation von monokotylen Pflanzen zu entsprechen (Joshi et al. 1997). Dadurch wird eine effektive Translationsinitiation erreicht, wenn das Element in die untranslatierte Leader Region eines Gens transponiert.

Mit den Veränderungen in *GTDs B* gelang es, die * Werte von 4, 13 und 11 (A1, A2, A3) auf 12, 11 und 11 zu verändern (Abbildung 4). Dabei bekamen alle drei Spleißstellen nun die maximale * Bewertung für den Konsensus und die Nutzung zusammen mit anderen Spleißstellen (P und rho). Ein minimaler Wert (A1: 2 oder A2, A3: 1) bei der Bewertung konkurrierender Spleißstellen (gamma) zeigte, dass keine der drei Spleißstellen gegenüber den anderen beiden Spleißstellen bei der Selektion stark bevorzugt werden sollte. Trotz der Abweichung vom weiteren Konsensus erhielt A1 die höchste * Bewertung, dies läßt sich über die präferentielle Selektion dieser Spleißstelle durch den "scanning" Mechanismus erklären (Simpson und Filipowicz 1996). Zumindest nach der theoretischen Vorhersage sollte so eine effektive Nutzung aller drei Spleißstellen der 3A-Site in *GTDs B* erfolgen.

3.1.2 Klonierung des Gene Trap Elementes *GTDs B*

Zur Klonierung von *GTDs B* wurde *GTDs A* zunächst in den Vektor pBluescript (2.1.8) umkloniert. Mit der PCR basierten SOE Methode (Horton et al. 1989) wurde die *in-silico* entwickelte Sequenz in *GTDs A* eingefügt, welche die unter 3.1.1 entwickelten Änderungen enthielt. Im ersten Schritt wurden in zwei getrennten PCR Reaktionen zwei Bereiche des *GTDs A* Elementes amplifiziert (2.2.13). Die Primer der ersten PCR (2.2.13) binden im Bluescriptvektor von *GTDs A* 114 bp upstream des 5' Endes des *GTDs A* Elementes und upstream vor der 3A-Site. Es entsteht ein 603 bp großes Amplifikat. Die Primer der zweiten PCR (2.2.13) binden downstream der 3A-Site und an Position +609 vom Translationsstart des GUS Reportergens,

Im Verhältnis zum Wirtsgen kann das GUS Reporter-gen dabei in drei Leserahmen liegen, daher sollten alle drei Spleißakzeptorstellen der 3A-Site benutzt werden, so dass in einem der Transkripte das GUS im Leserahmen des Wirtsgens liegt. Bei der Integration in ein Exon sollte die Nutzung der Spleißdonorstellen der 4D-Site und der Spleißakzeptorstellen der 3A-Site erfolgen (Abbildung 1), welche dieser Spleißstellen tatsächlich aktiviert werden, war Gegenstand der Untersuchung. Bei Integration in ein Intron sollte untersucht werden, ob es nach der Optimierung von *GTDs B* (3.1.1) Unterschiede in der Erkennung und Nutzung der Element eigenen Spleißstellen zwischen *GTDs A* und *GTDs B* gibt, und wie die Häufigkeit der Nutzung der einzelnen 3A-Site Spleißstellen zueinander ist. Für die Untersuchung der Spleißstellennutzung wurde ein transienter Testansatz verwendet. Es wurden Testkonstrukte kloniert, welche die Integration von *GTDs A* und *GTDs B* in ein Exon und in ein Intron simulieren. Die Testkonstrukte wurden mittels biolistischer Transformation (Sanford 1988) in die Gerstenzellen gebracht. Dabei wurde die DNA an Goldpartikel gebunden, und diese wurden mit Druck in die Zellen geschossen (2.2.2). Als Zielgewebe wurden Skutella frisch isolierter unreifer Gerstenembryonen cv. Golden Promise verwendet. Durch die Nutzung von Skutellumgewebe unreifer Embryonen der Zielpflanze sollte der eingesetzte transiente *in vitro* Testansatz den Gegebenheiten in der Pflanze möglichst nahe kommen. Außerdem bietet ein transienter Test eine schnelle und einfache Möglichkeit der experimentellen Überprüfung der *GTDs* Elemente. Solche transienten Tests wurden bereits von Hensgens et al. (1993) und McElroy et al. (1997) erfolgreich eingesetzt.

Im folgenden wurde die Benutzung der Spleißstellen von *GTDs A* und *B* bei Integration der Elemente in ein Exon untersucht.

3.2.1 Untersuchung der Spleißstellenbenutzung bei Integration in ein Exon

Ziel dieses Ansatzes war es, Informationen über die Benutzung der in den Elementen *GTDs A* und *B* enthaltenen Donor- und Akzeptorspleißstellen zu gewinnen, wenn die Integration des Elementes in ein Exon des Wirtsgenoms erfolgt ist (siehe Abbildung 1B). Betrachtet man die sich ergebenden Spleißmöglichkeiten, so entsteht in einem solchen Fall eine komplexe Situation, da mindestens vier Donor- (D1 -D4) und drei Akzeptorspleißstellen (A1, A2 und A3) im Element benutzt werden können. Dabei können maximal 12 verschiedene Spleißprodukte entstehen. Die Translation eines Drittels dieser Spleißprodukte würde zu einer C-terminalen Fusion von GUS an das Genprodukt führen.

Um ein solches Integrationsereignis zu simulieren, wurde *GTDs A* bzw. *B* in das dritte Exon des Weizen *gbss1* Gens (Kluth et al. 2002) in das Basisplasmid pUbiGBSSI (2.1.8 und Abbildung 7) kloniert. Das *gbss1* Gen repräsentiert mit seiner Intron/Exon Struktur ein typisches pflanzliches Gen. Die *Gene-Trap* Elemente *GTDs A* und *B* wurden jeweils mit *ClaI* und *EcoRI* (2.1.5) aus dem pBluescript Vektor ausgeschnitten und die durch die Restriktion 5' überhängenden Enden mit Hilfe des Klenow Fragmentes (2.1.5) aufgefüllt (2.2.14). pUbiGBSSI wurde mit *SalI* (2.1.5), welches nur im dritten Exon von *gbss1* schneidet, restringiert, danach wurden

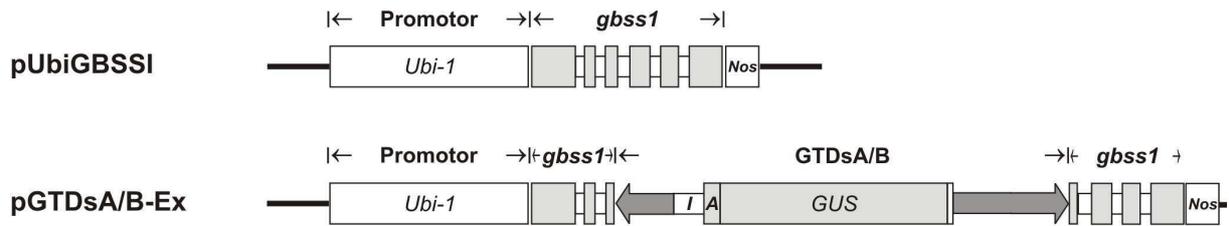


Abbildung 7: Schematische Darstellung von pUbiGBSSI und der Exon Testerplasmide

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung von pUbiGBSSI (oben) und der Exon Testerplasmide für *GTDs A* und *B* (unten). Kleine ungefüllte Boxen stehen für Intronsequenzen, große graue Boxen für Exonsequenzen. Die dunklen Pfeile deuten die *Ac*-Sequenzen an, die dünne schwarze Linie die pBluescript Vektorsequenzen. Weitere Abkürzungen: Ubi-1 = Ubiquitin Promotor, I = *actin1* Intron in *GTDs*, A = 3A-Site, Nos = Nos-Terminator im pUbiGBSSI.

mit dem Klenow Fragment (2.1.5) die Enden aufgefüllt und mit CIP (2.1.5) die Phosphatreste entfernt, um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Dann wurde das jeweilige *GTDs* Fragment in pUbiGBSSI ligiert (2.2.14). Die korrekte Klonierung der Übergangsstellen wurde durch eine Sequenzierung überprüft (2.1.4). Die resultierenden Exon Tester Konstrukte wurden mit *GTDs A-Ex* und *GTDs B-Ex* bezeichnet (Abbildung 7).

Die beiden Plasmide wurden zur biolistischen Transformation von Skutellumgewebe (2.2.3) verwendet. 24 Stunden nach der Transformation wurde gesamt RNA aus dem beschossenen Skutellumgewebe mit dem TriZOL Reagenz (2.1.1) isoliert, die anschließende Aufreinigung der mRNA wurde mit dem PolyATract System (2.1.2) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die prozessierten GBSS1:GUS Transkripte wurden mittels revers transkribierter PCR (RT-PCR) analysiert.

Für die Erststrangsynthese und nachfolgende PCR Amplifikation wurde das Superscript One-Step RT-PCR System (2.1.2) benutzt. Für die RT-PCR (2.2.15) wurden 769 ng und 249 ng mRNA aus *GTDs A-Ex* transformiertem Gewebe und 376 ng und 175 ng aus *GTDs B-Ex* transformiertem Gewebe eingesetzt.

Die Amplifikate wurden auf einem Gel aufgetrennt. Ziel dabei war es, die einzelnen Spleißereignisse anhand ihrer Größe zu identifizieren. Der Abstand zwischen dem größten und dem kleinsten möglichen cDNA Fragment beträgt für *GTDs A* 32 bp und *GTDs B* 28 bp. Der kleinste Abstand zwischen den cDNA Fragmenten ist bei *GTDs A* 2 bp und bei *GTDs B* 1 bp. Um die nötige Auftrennung zu erreichen, wurde ein denaturierendes 5% Acrylamid-Sequenziergel eingesetzt. Zur eindeutigen Identifizierung der möglichen Spleißprodukte wurden Kontrollfragmente bekannter Größe als Referenz benutzt. Diese Kontrollfragmente entsprechen bekannten D1A1 und D3A1 Spleißprodukten für *GTDs A* und *B*, und wurden in früheren Experimenten kloniert und per PCR amplifiziert (2.2.17). Als Größenstandard, der die Größenunterscheidung in der Dimension einzelner Basen ermöglicht, wurde eine Sequenzreaktion über Kettenabbrüche nach Sanger et al. (1977) benutzt. Diese Sequenzreaktion (2.2.11) wurde mit dem "Dig

Taq DNA Sequencing Kit” (2.1.2) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template dienten dabei in früheren Versuchen isolierte, über D1A1 gespleißte, PCR-Fragmente. Damit läßt sich jedes DNA-Fragment im Gel einer genauen Größe zuordnen, und anhand der Größe einem definierten Spleißprodukt.

Das hier verwendete nicht radioaktive Dig System ist sehr sensitiv, DNA Mengen ab 10 pg lassen sich nachweisen (“The DIG System User’s Guide for Filter Hybridisation” (Roche Diagnostics)). Alle PCR Reaktionen wurden mit dem gleichen 5’ Digoxigenin markierten Primer durchgeführt.

Etwa 100 ng der RT-PCR Produkte und eine experimentell ermittelte Menge der Kontrollfragmente wurden auf einem 5%igen denaturierenden Acrylamid-Sequenziergel aufgetrennt. Danach wurde die aufgetrennte DNA auf eine Nylon Membran transferiert (Nach “Dig Taq DNA Sequencing Kit for Standard and Cycle Sequencing” (Roche Diagnostics)). Der DIG Nachweis wurde wie in 2.2.5 angegeben durchgeführt.

Nach der Auftrennung wurden die Sequenzen der einzelnen Produkte bestimmt, um so die über die Größe erfolgte Zuordnung zu verifizieren. Dafür wurden die kovalent an die Nylon Membran gebundenen Amplifikationsprodukte als Template für eine Reamplifikation benutzt. Membranfragmente, welche Dig-markierte Amplifikate gebunden haben, wurden aus der Membran ausgeschnitten. Eine Reamplifikation der Membran gebundenen RT-PCR Produkte erfolgte modifiziert nach Sheikh und Lazarus (1997). Bei der Reamplifikation ergibt sich hier die Schwierigkeit, dass sich verschiedene einzelsträngige DNA Fragmente an der gleichen Position im Gel und somit auch im isolierten Membranstück befinden können. Dies resultiert daraus, dass in dem verwendeten denaturierenden Gel beide DNA Stränge getrennt werden, von denen nur einer mit Digoxigenin markiert ist. Durch die Markierung wird der Strang von der Gelmatrix stärker zurückgehalten als der nicht markierte, die beiden Stränge trennen sich trotz gleicher Größe auf. Um ausschließlich solche Fragmente zu reamplifizieren, die einem auf Grund der Dig-Markierung detektierten Fragment entsprechen, wurden diese Fragmente in einer linearen PCR Reaktion (2.2.12) mit nur einem Primer, welcher an den markierten Strang bindet, amplifiziert (Reamp1 (2.1.10)). In dieser Reaktion findet keine exponentielle, sondern nur eine lineare Amplifikation statt.

15 μ l des Amplifikates aus der ersten Reaktion wurden als Template in einer zweiten Reaktion eingesetzt. In dieser war das Membranstück mit den möglichen alternativen DNA Fragmenten nicht mehr enthalten, und es wurden zwei Primer eingesetzt (Reamp1 und GTRT2-3, 2.2.12). Eine dritte PCR mit einem im Vergleich zu Reamp1 weiter downstream liegenden Primer (Reamp3) wurde mit 1 μ l Produkt der zweiten PCR Reaktion als Template durchgeführt. (2.2.12). Die erhaltenen PCR Fragmente wurden in pCR2.1 (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) subkloniert und sequenziert (2.1.4). Die Technik ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

Die Benennung der PCR Produkte erfolgte über die Kombination der benutzten Donorstelle (Dx, x entspricht der Position der Donorstelle in Abbildung 6) und der Akzeptorstelle (Ax).

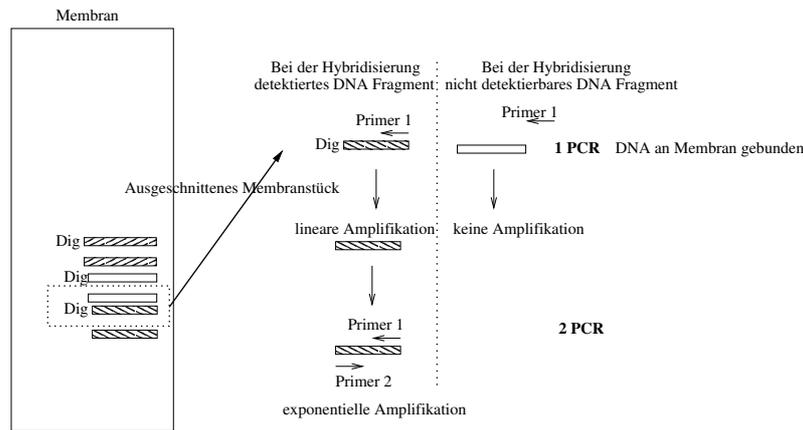
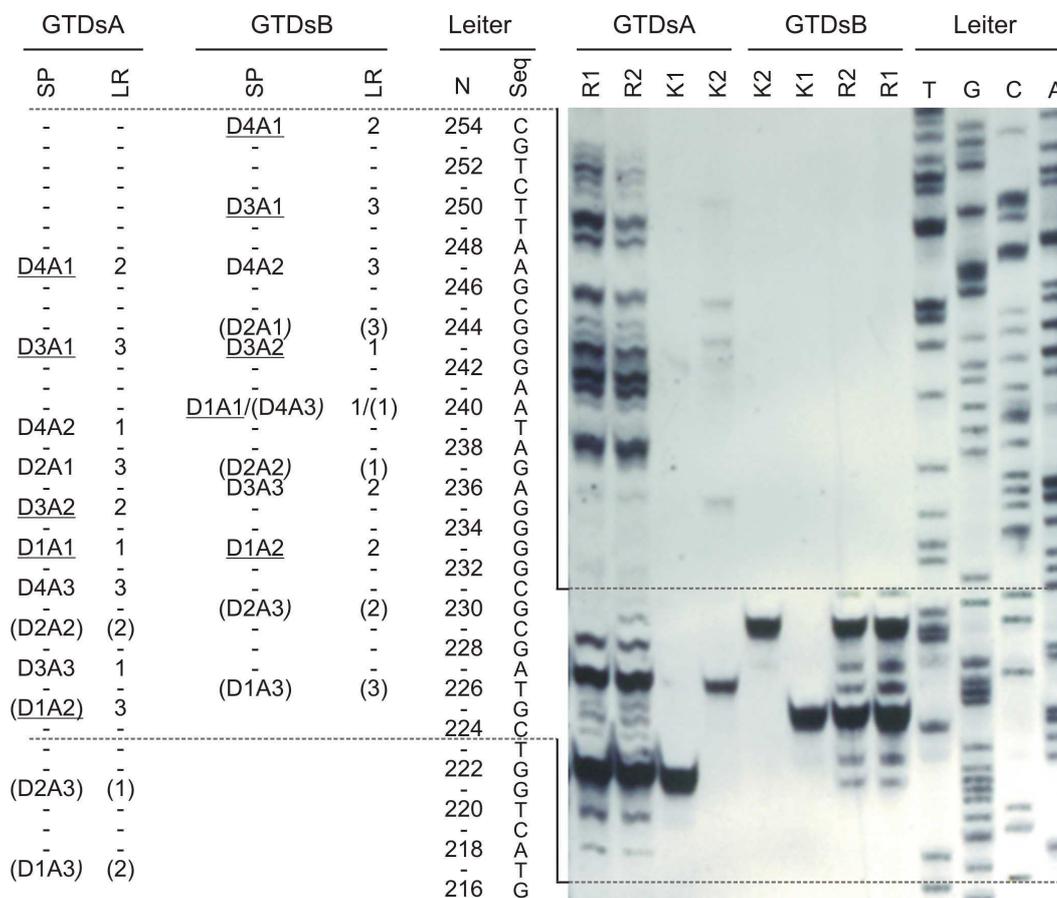


Abbildung 8: **Schematische Darstellung der Reamplifizierung von membrangebundener DNA**

Links: Schematische Darstellung der Amplifikate nach der Auftrennung in einem Polyacrylamid Gel und Transfer auf eine Nylon Membran. Die Boxen mit jeweils der selben Füllung symbolisieren die beiden Stränge der Amplikate, mit "Dig" ist der Digoxigenin-markierte Strang gekennzeichnet. Das durch eine gepunktete Linie gebildete Rechteck deutet das aus der Membran geschnittene Stück an. Rechts: Schematische Darstellung der PCR Strategie. Im linken Teil der Abbildung kann der Primer 1 (Pfeil) an das durch eine schraffierte Box dargestellte, Dig-markierte DNA Fragment binden und eine lineare Amplifikation (PCR 1), gefolgt von einer zweiten exponentiellen Amplifikation (PCR 2) durchgeführt werden. Im rechten Teil der Abbildung kann der Primer nicht an das DNA Fragment (ungefüllte Box) binden, es findet keine Amplifikation statt.

Abbildung 9 zeigt auf der rechten Seite das Autoradiogramm der RT-PCR Analyse und auf der linken Seite die Größenbestimmung der Fragmente und ihre Zuordnung zu definierten Spleißereignissen. Zusätzlich wurde der Leserahmen der putativen GUS Synthese für jedes identifizierte Spleißereignis bestimmt, wobei der Leserahmen des Spleißproduktes D1A1 als Leserahmen Nr. 1 definiert wurde.

Insgesamt wurden neun bzw. sieben Varianten des prozessierten *GTDs A* und *GTDs B* Transkripts identifiziert. Die Donor/Akzeptor Kombination D4A3 wurde nur in pGTDs A-Ex gefunden. Bei pGTDs B-Ex hätte ein Fragment dieser Kombination dieselbe Größe wie das Produkt D1A1, und würde daher mit diesem im Gel auf der gleichen Position liegen, und so eine Unterscheidung unmöglich machen. Auch bei einer Reamplifizierung der entsprechenden Bande wurde nur das D1A1 Transkript gefunden. Höchstwahrscheinlich, weil dieses die überwiegende Mehrheit der RT-PCR Produkte darstellt, und die zur Reamplifikation eingesetzte PCR dieses Ungleichgewicht noch weiter verstärkt. Somit kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass auch bei *GTDs B* die Spleißkombination D4A3 benutzt wird. Für beide Elemente läßt sich anhand der Bandenstärke eine Präferenz der Donorstellen D1 und D3 in Kombination mit der Akzeptorstelle A1 feststellen. Eine genaue Aussage darüber ist aus der Intensität der Bande jedoch nicht zu ziehen, da durch die Amplifikation in der RT-PCR das ursprüngliche Mengenverhältnis der DNA Fragmente zueinander wahrscheinlich nicht mehr vorliegt, sondern häufige Produkte stärker amplifiziert werden als seltene. Die-

Abbildung 9: **Ergebnisse der RT-PCR Analyse**

Im rechten Teil der Abbildung ist die Autoradiographie der durch die RT-PCR von cDNA aus transient transformierten Gerstenskutella erhaltenen Produkte gezeigt. Die Produkte des mit GTDsA-Ex und GTDsB-Ex transformierten Gewebes sind in den Spuren R1 und R2 dargestellt. Per PCR amplifizierte Spleißprodukte der Kombination D1A1 und D3A1 sind für beide Elemente in den Spuren K1 und K2 abgebildet. Eine Sequenzreaktion wurde als Größenstandard benutzt und befindet sich in den vier ganz rechten Spuren. Im linken Teil der Abbildung sind die Ergebnisse der Analyse zusammengestellt. Die Namen der PCR Produkte wurden DxAy abgekürzt, wobei x und y die Reihenfolge der Spleißstellen nach Abbildung 6 darstellt. Subklonierte und sequenzierte Produkte sind unterstrichen, erwartete, aber nicht gefundene, in Klammern in den Spuren SP jeweils für *GTDs A* und *GTDs B* abgebildet. Die nur über ihre Größe identifizierten Spleißprodukte sind normal dargestellt. Zusätzlich symbolisieren die Nummern eins bis drei in der Spur LR den Leserahmen der GUS Synthese dieses spezifischen Spleißereignisses. Die Kombination D1A1 wurde dabei als Leserahmen eins definiert. Die ganz rechts abgebildete Leiter zeigt Details der Sequenz (Seq) eines subklonierten D1A1 Spleißereignisses und die Größe des DNA Fragmentes in Nukleotiden (N).

se Tatsache und das häufige Subklonieren der Spleißereignisse D1A1 und D3A1 in früheren Experimenten stützt diese Interpretation.

Die Nutzung der Spleißstellen D1, D3 und D4 sowie A1, A2 und A3 wurde in verschiedenen Kombinationen beobachtet (Abbildung 9). Die Kombination D1A3 und die Benutzung von D2, mit Ausnahme eines D2A1 Spleißereignisses in pGTDs A-Ex transformierten Gewebe, konnte nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die in *GTDs A/B* enthaltenen Donorstellen (D1, D3 und D4) in Kombination mit allen Akzeptorstellen (A1, A2 und A3) beim Spleißen benutzt werden, wobei eine Präferenz für die Kombinationen D1A1 und D3A1 zu bestehen scheint. Auf den Nachweis des GUS Reporters bei Integration von *GTDs A/B* in ein Exon des Wirtsgenoms bezogen, würde dies für jeden möglichen Leserahmen mindestens zwei unterschiedliche Transkripte bedeuten, deren Translation zu einer C-terminalen GUS-Fusion führt. Die mögliche Präferenz für D1A1 und D3A1 würde dabei bereits zwei der drei möglichen Leserahmen abdecken.

Der wichtigste Unterschied zwischen den RT-PCR Produkten von *GTDs A* und *GTDs B* liegt aber darin, dass bei *GTDs A* diverse RT-PCR Fragmente einer unerwarteten Größe zwischen 266 und 314 bp auftreten (siehe Abbildung 9). Dies deutet auf die Benutzung kryptischer Donor- und Akzeptorstellen in *GTDs A* hin. Diese Donorstellen liegen downstream von D4, die Akzeptorstellen upstream von A1. In *GTDs A* findet sich eine Akzeptorstelle, die in *GTDs B* nicht vorhanden ist (siehe Abbildung 4). Die Benutzung dieser Spleißstelle in Kombination mit der 4D-Site kann drei der auftretenden Banden erklären. "Splice predictor" ordnet ihr einen P Wert von 3 zu (*GTDs A* A1 = 4), da sie aber upstream von A1 liegt, würde sie bei einem "scanning" Mechanismus (Simpson und Filipowicz 1996) des Spleißeosoms in Konkurrenz mit den Spleißstellen der 3A-Site treten.

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass alle Spleißstellen der 3A-Site in beiden Elementen erkannt werden. Ebenso werden drei der vier Spleißdonorstellen benutzt. In *GTDs A* kommt es zu einer Nutzung alternativer Spleißstellen. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Spleißstellenerkennung der 3A-Site in *GTDs B* im Vergleich zu *GTDs A* stringenter ist. Dadurch sollte es in *GTDs B* zu einer höheren Menge an über die 3A-Site Akzeptorstellen gespleißten Transkripts kommen. Dies wird in den nachfolgenden Experimenten überprüft.

3.2.2 Untersuchung der 3A Spleißstellenbenutzung

Erfolgt die Integration von *GTDs* in ein Intron, so werden die Spleißdonorstelle am Exon/Intron Übergang des unterbrochenen Wirtsgens und die Spleißakzeptorstellen in der 3A-Site des *GTDs* benutzt. Daraus resultieren drei Transkripte, von denen eines im Leserahmen des Wirtsgens liegt und somit zu einem funktionalem Wirtsgen:GUS Fusionsenzym führt. Ziel des hier verfolgten Ansatzes war es, die Spleißstellen der 3A-Site unabhängig von den Spleißstellen der 4D-Site zu testen. Dabei wurden drei Fragestellungen untersucht. Zum ersten die Frage, ob die Spleißstellen der 3A-Site überhaupt genutzt werden. Zum zweiten, ob es dabei Unterschiede

in der Nutzungsfrequenz der einzelnen Spleißstellen untereinander gibt. Und als drittes einen Vergleich zwischen der Spleißstellennutzung zwischen *GTDs A* und *GTDs B*, insbesondere in Hinblick darauf, ob *GTDs B* nach den theoretischen Überlegungen in 3.1.1 gegenüber *GTDs A* verbessert werden konnte. Zur Beantwortung dieser Fragen muß das verwendete Testsystem die Integration von *GTDs* in ein Intron möglichst realitätsnah simulieren, und die Ergebnisse für die Nutzung der einzelnen Spleißstellen müssen quantifizierbar sein, um eine Berechnung der proportionalen Aktivierung der Spleißstellen zueinander innerhalb eines Elementes und den Vergleich der Spleißstellen zwischen den beiden Elementen zu ermöglichen.

3.2.2.1 Erstellung eines Intron Testsystems

Für eine Quantifizierung der Nutzung einzelner 3A-Site Spleißstellen wurde ein indirekter Nachweis des Spleißens über den Nachweis der GUS-Expression in mit entsprechenden Testplasmiden transformierten Gerstenskutella eingesetzt. Als Basis für die Klonierung der Intron Testerkonstrukte diente das Plasmid pUbiGBSSI (2.1.8 und Abbildung 7). Jedes der drei Testerkonstrukte für *GTDs A* und *B* (Abbildung 11) ist so angelegt, dass die Benutzung der 5' Spleißdonorstelle im fünften Intron von *gbss1* in Kombination mit jeweils einer der drei Spleißakzeptorstellen (A1,A2 oder A3) im *GTDs* zu einer GBSS1:GUS Fusion führt. Für alle Konstrukte wurde das *GTDs A* und *B* Element in die aufgefüllte *PflMI* Restriktionsschnittstelle (2.1.5) im fünften Intron des *gbss1* Gens in pUbiGBSSI integriert. Die *GTDs* Elemente wurden mit einem *HindIII/EcoRI* Schnitt (2.1.5) aus pGTDs A und pGTDs B herausgeschnitten, die 5' überhängenden Enden der Fragmente wurden mit Hilfe des Klenow Fragments (2.1.5) aufgefüllt. Die daraus resultierenden Plasmide wurden pGTDs A-Int und pGTDs B-Int genannt.

Um den Leserahmen für die GUS Synthese um ein Nukleotid zu verschieben, wurde eine einzelne Base in das 3' Ende des fünften Exons von *gbss1* eingefügt. Wieder wurde der von Horton et al. (1989) beschriebene SOE PCR Ansatz eingesetzt (Abbildung 10A). Mit den Plasmiden GTDs A-Int bzw. GTDs B-Int als Template DNA wurde je eine PCR mit den Primern Soe1 und SoeM-L (2.1.10) und je eine PCR mit den Primern Soe4 und SoeM-U (2.1.10) durchgeführt (2.2.16). 200 ng des jeweiligen PCR Produktes wurden, nach einer Größenkontrolle in einem Agarosegel, gemischt und mit den Primern Soe1 und Soe4 in einer zweiten PCR Reaktion mit den selben Parametern wie in der ersten Reaktion eingesetzt. Dadurch wurde ein zusätzlich zur Originalsequenz in den Primern SoeM-L und Soe-M-U (2.1.10) enthaltenes Nukleotid in die Sequenz eingebaut. Das PCR Produkt wurde mit *PacI* und *SalI* restringiert (2.1.5), ebenso pGTDs A-Int und pGTDs B-Int, und nachfolgend wurde das rekombinante PCR Produkt in pGTDs A-Int und pGTDs B-Int ligiert, und somit die ursprüngliche Sequenz durch die neue Sequenz ersetzt. Die erhaltenen Plasmide wurden GTDs A-Int+1 bzw. GTDs B-Int+1 genannt.

Um den Leserahmen für die GUS Synthese um zwei Nukleotide zu verschieben, wurde die *SalI* Restriktionsschnittstelle (2.1.5) von GTDs A-Int und GTDs B-Int partiell, unter Verwendung der Nukleotide C, G und T, mit Hilfe des Klenow Fragments (2.1.5) aufgefüllt und der restliche

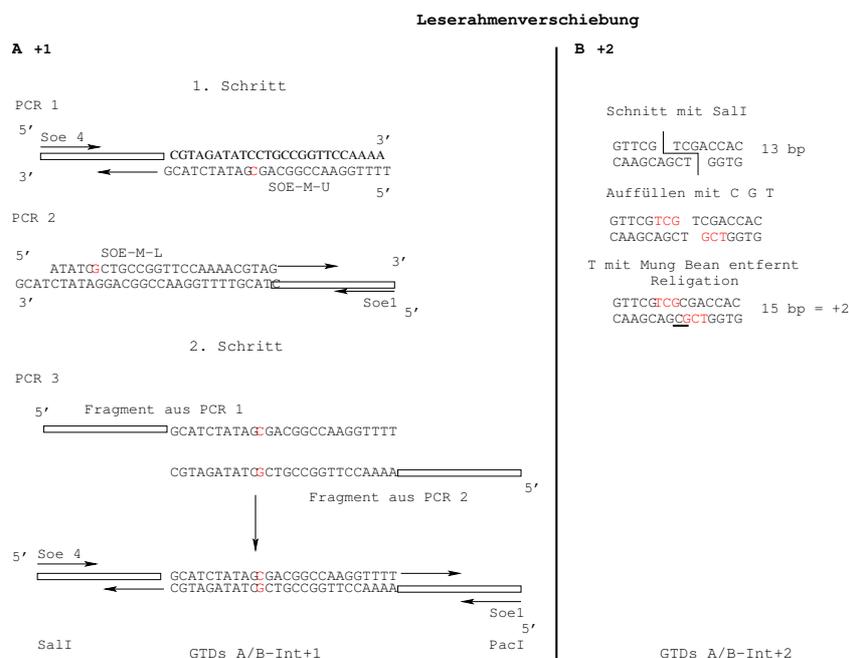


Abbildung 10: Klonierungsstrategie der Introntester GTDs A/B-Int+1 und GTDs A/B-Int+2

In Teil A der Abbildung ist die zur Verschiebung des Leserahmens um ein Nukleotid verwendete Strategie schematisch abgebildet, in Teil B die Verschiebung um zwei Nukleotide. Die rot dargestellten Basen stellen die eingeführte Veränderung dar.

5' T-Überhang vor der Religation mit Hilfe von "MungBean" Nuklease (2.1.5) entfernt (Abbildung 10B). Die erhaltenen Plasmide wurden GTDsA-Int+2 und GTDsB-Int+2 genannt. Die korrekte Klonierung an den Übergängen zwischen dem *GTDs* Element und dem *gbss1* Gen, sowie die Veränderungen, die zur Verschiebung des Leserahmens führen, wurde für alle Tester Konstrukte durch eine Sequenzierung überprüft (2.1.4). Die Verschiebung des Leserahmens erfolgte bei allen Konstrukten derart, dass in dem zur GUS Synthese verwendeten Leserahmen durch die Verschiebung keine Stop Codons eingeführt worden sind.

Damit standen je *GTDs* Element drei Introntester Konstrukte zur Verfügung, bei denen die Benutzung der Spleißdonorstelle im fünften Intron von *gbss1* in Kombination mit jeweils einer der drei Akzeptorstellen im *GTDs* zu einer GBSS1:GUS Fusion führt. Beispielsweise führt die Benutzung von A1 (GTDs A-Int) bzw. A2 (GTDs B-Int) in Kombination mit der 5' Spleißdonorstelle im *gbss1* Gen zur Synthese einer C-Terminalen GUS Fusion in mit pGTDsA-Int und pGTDs B-Int transformiertem Gewebe. Werden die anderen Akzeptorstellen in der 3A-Site benutzt, liegt das GUS nicht im Leserahmen von GBSS1 und ist somit nicht funktional, noch dazu resultiert ein Abbruch der Proteinsynthese durch ein Stop Codon. Falls ein Spleißen über die Spleißdonorstellen im Element erfolgt, so kann nur bei GTDs A-Int+1 und GTDs B-Int ein alternatives Spleißereignis über D1 und D2 im 5' Ende des *GTDs* Elementes zu einem GUS Protein führen. Ein UAA Stop Codon verhindert eine Translation, wenn D3 und weiter downstream gelegene Spleißstellen aktiviert werden. In allen anderen Testerkonstrukten, GTDs A-Int, GTDs B-Int+1 und GTDs A/B-Int+2, führt eine Benutzung der Donorstellen im

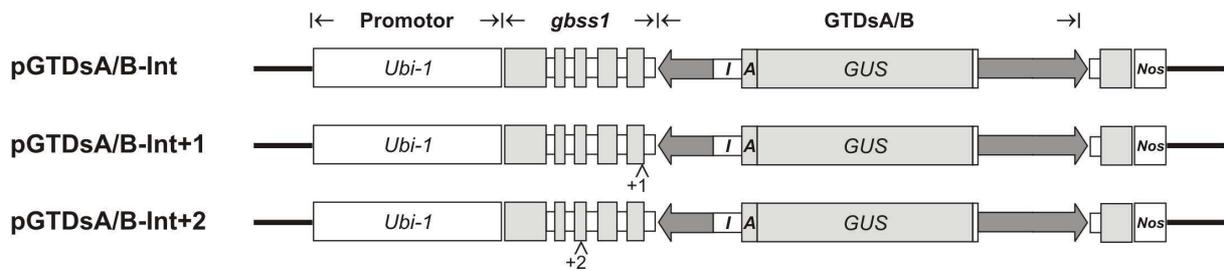


Abbildung 11: **Schematische Darstellung der Intron Testerplasmide pGTDs A/B Int**
 Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der drei Intron Testerplasmide für *GTDs A* und *B*, beginnend mit pGTDs A/B Int (oben) über pGTDs A/B Int+1 (Mitte) zu pGTDs A/B Int+2 (unten). Kleine ungefüllte Boxen stehen für Intronsequenzen, große graue Boxen für Exonsequenzen. Die dunklen Pfeile deuten die *Ac*-Sequenzen an, die dünne schwarze Linie die pBluescript Vektorsequenzen. Weitere Abkürzungen: Ubi-1 = Ubiquitin Promotor, I = actin-1 Intron in *GTDs*, A = 3A-Site, Nos = Nos-Terminator im pUbiGBSSI. +1, +2 = an dieser Stelle eingefügte Basen.

Element zur einem Abbruch der Proteinsynthese. In dem Fall, dass kein Spleißen stattfindet, fungiert das TAA reiche 3' *Ac* Ende als ein UAA Stop Codon, wenn die transkribierte mRNA translatiert wird. Zusätzlich wurden mittels "Splice predictor" (Brendel und Kleffe 1998) drei mögliche alternative Spleißstellen in der *gbs1* Gensequenz entdeckt. Die Benutzung einer dieser Spleißstellen kann generell die Häufigkeit der detektierten GUS Aktivität beeinflussen, da die Aktivierung dieser Spleißstelle zu einem Abbruch der Proteinsynthese durch ein Stop Codon führt. Der Grad der Beeinflussung sollte aber für alle Testkonstrukte gleich sein. Die Aktivierung der anderen beiden alternativen Spleißstellen hat keinen Einfluß auf den experimentellen Ansatz, da die Proteinsynthese weder abbricht, noch der Leserahmen des GBSS1 verschoben wird. Zusammenfassend erlaubt dieser experimentelle Ansatz einen indirekten Nachweis von Spleißereignissen in den künstlichen Spleißakzeptorstellen A1, A2 und A3.

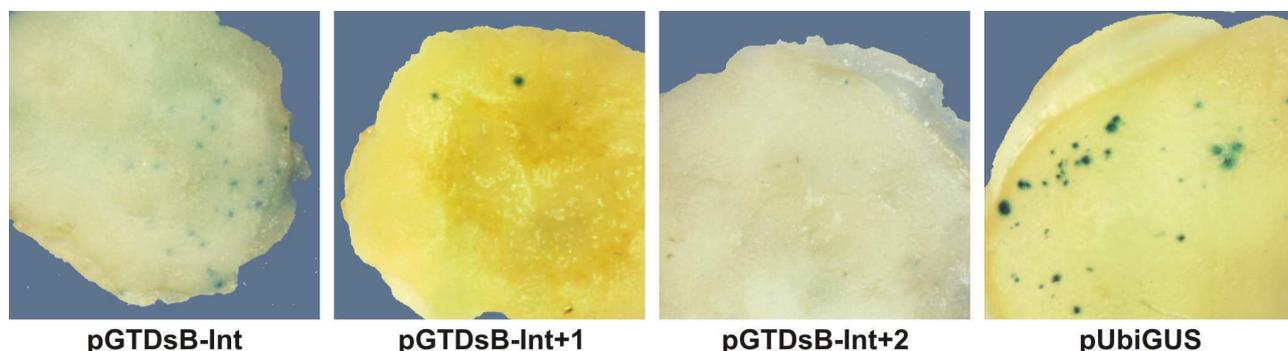
3.2.2.2 Nachweis der Nutzung von Spleißakzeptorstellen der 3A-Site

Zur Durchführung des Nachweises wurde Skutellumgewebe aus unreifen Gerstenembryonen cv. Golden Promise für die biolistische Transformation mit Mikroprojekten einen Tag nach der Isolierung der unreifen Embryonen nach Becker et al. (1994) eingesetzt (2.2.3).

Zwei Konstrukte zur Expression von Transkriptionsfaktoren des Mais Anthocyan Syntheseweges (pAct::C1, pAct::R (2.1.8)) wurden bei allen Experimenten kotransformiert und als interner Standard für die Normalisierung der Versuche benutzt. Damit können technische Abweichungen bei der Durchführung der Transformation und der jeweilige physiologische Status des Zielgewebes ausgeglichen werden. Des weiteren wurde Skutellumgewebe mit einem unter Kontrolle des konstitutiven Ubiquitin Promotors stehenden GUS-Gens (pUbiGUS (2.1.8)) transformiert, um einen Referenzwert für die GUS-Expression zu erhalten, der unabhängig von Spleißereignissen in der *gbs1* Sequenz oder in den Spleißstellen der *GTDs* Elemente ist. Dabei wird die GUS-Expression von dem selben Promotor kontrolliert, wie die GBSS1:GUS Fusionen

in den Introntester Konstrukten. Als negative Kontrolle wurden die Plasmide pGTDs A und pGTDs B verwendet, um eine von ihnen verursachte GUS-Expression auszuschließen. Die Synthese von GUS wurde durch eine histochemische Färbung des Skutellumgewebes von unreifen Embryonen, die mit den Testkonstrukten transformiert wurden, gezeigt. Dabei wurde jeder blaue Punkt auf der Skutellumoberfläche als ein unabhängiges Spleißereignis gewertet und eine Normalisierung durch eine Berechnung der GUS Signale pro Anthocyan-Signal durchgeführt, um experimentelle Schwankungen auszugleichen. Die proportionale Rate der A1, A2 und A3 Aktivierung ist als Prozentsatz des pUbiGUS Referenzwertes (100%) angegeben. Jeder transiente Expressions Assay wurde für jedes Testerkonstrukt mindestens zweimal durchgeführt. In jedem Assay fanden drei bis sieben unabhängige Transformationen mit jeweils durchschnittlich 40 unreifen Embryonen statt. Die Plasmide (pGTDsA/B, je drei Plasmide der *GTDs A* und *B* Introntester und der interne Standard pAct::C1, pAct::R) wurden in den Transformationsexperimenten in einem molaren Verhältnis von etwa 65:1:1 eingesetzt. Das beschossene Gewebe wurde für 36 Stunden bei 26 °C im Dunklen inkubiert. Nachfolgend wurden die Anthocyan-Signale unter dem Binokular gezählt und im Anschluß die histochemische GUS Färbung für 16 Stunden bei 37 °C im Dunklen nach Jefferson (1987) durchgeführt (2.2.6). Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den Abbildungen 12 und 13 zusammengefasst.

Bei allen Testkonstrukten, bis auf pGTDs A-Int+2, bei dem die Aktivierung von A3 für die Synthese von GUS erforderlich ist, wurden GUS Signale nachgewiesen (Abbildung 12). Bei den als Kontrolle verwendeten Plasmiden pGTDs A und B konnten, wie erwartet, keine Signale detektiert werden. Jedoch zeigten sich deutliche Unterschiede in der GUS Signalzahl und somit indirekt in der Nutzung von A1, A2 und A3 zwischen den beiden Elementen *GTDs A* und *GTDs B*. Beide Elemente zeigen eine präferentielle Nutzung der Spleißstelle A1. Dabei zeigt *GTDs A* nur 1,9% relative Aktivität im Bezug auf die Expressionssignale von pUbiGUS, *GTDs B* hingegen 53%. *GTDs B* A2 und A3 zeigen immerhin noch 4,7% bzw. 4,3% relative Aktivität, während *GTDs A* A2 mit 0,005% eine verschwindend geringe Aktivität zeigt und bei A3 überhaupt keine Aktivität nachweisbar ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 zusammengefasst. In 13A sind die Ergebnisse in einem Balkendiagramm graphisch, in 13B tabellarisch dargestellt. Hier erkennt man, dass die Spleißstelle A1 in *GTDs B* transformiertem Gewebe etwa 27 mal häufiger benutzt wurde als in entsprechenden mit dem *GTDs A* Konstrukt (*GTDs A*-Int +1) transformiertem Gewebe. Ein Vergleich der Frequenzen für A2 in *GTDs A* und B zeigt eine etwa 850 mal häufigere Benutzung in *GTDs B*. Ein Vergleich der Frequenzen von A3 zwischen den Elementen war nicht möglich, da in dem mit dem entsprechenden *GTDs A* Testkonstrukt (*GTDs A*-Int+2) transformierten Gewebe keine Signale detektiert werden konnten. Im Vergleich *GTDs A* zu *GTDs B* zeigt sich, dass in *GTDs B* schon die Spleißstelle mit der niedrigsten Nutzungsfrequenz, A3, eine immerhin noch doppelt so hohe Frequenz zeigt wie die am stärksten benutzte Spleißstelle in *GTDs A* (A1). Zusätzlich zeigen diese Experimente, dass die Akzeptorstelle A1 deutlich bevorzugt wird, in *GTDs A* wird sie 344 mal häufiger verwendet als A2, in *GTDs B* 11 mal häufiger als A2. A2 in *GTDs B* ist wiederum mit geringfügig aktiver als A3 (1,09 mal) .

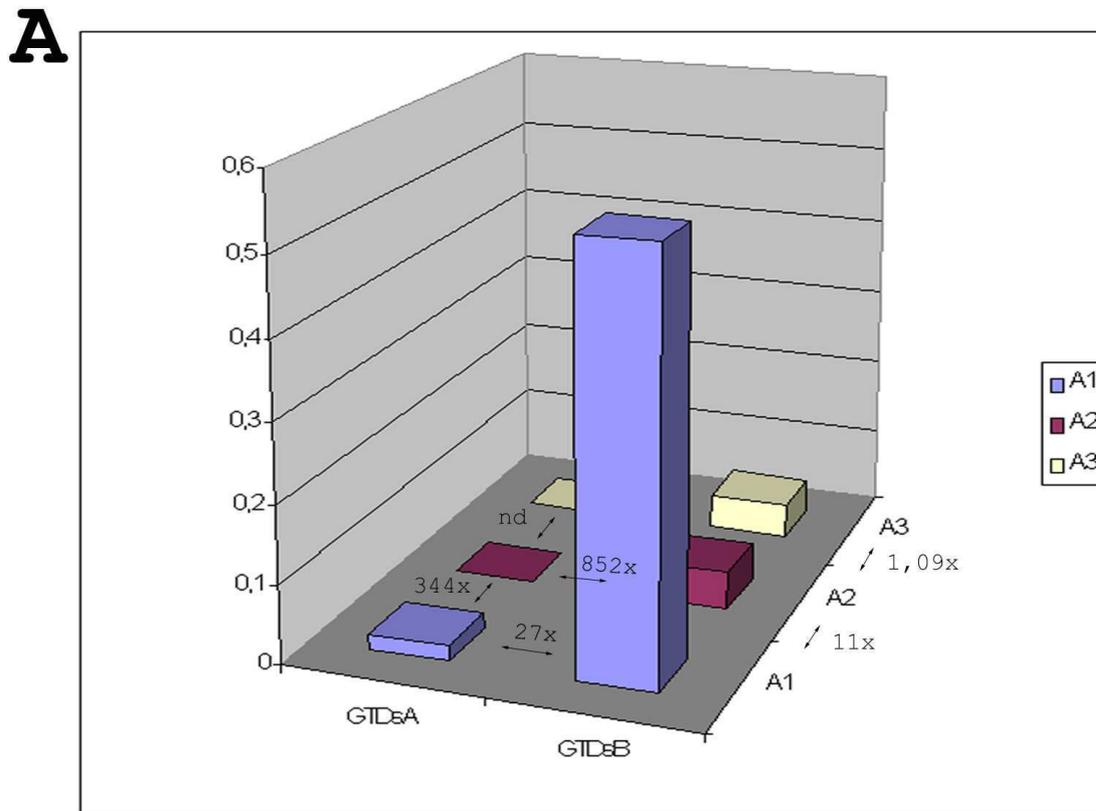


Spleiß-akzeptor	Konstrukt	Exp.	Transformierte Skutella	Anthocyan Signale	GUS Signale	GUS/Anthocyan	Relative Aktivität (%)
A1	GTDsA-Int+1	3	118	87	14	0.160	1.9
		5	240	415	70	0.169	
A2	GTDsA-Int	7	222	1867	2	1.07x10 ⁻³	0.005
		4	156	2234	0	nd	
A3	GTDsA-Int+2	5	185	1206	0	nd	nd
		6	279	516	0	nd	
A1	GTDsB-Int	7	271	904	4446	4.918	53
		6	219	245	912	3.722	
A2	GTDsB-Int+1	3	118	168	73	0.434	4.7
		5	262	332	134	0.406	
A3	GTDsB-Int+2	6	320	1197	455	0.380	4.3
		6	254	636	241	0.378	
	pUbiGUS	2	75	126	1443	11.452	100
		2	89	313	2263	7.230	
		1	34	73	758	10.383	

Abbildung 12: **Ergebnisse der 3A-Site Spleißstellenuntersuchung**

Im oberen Teil der Abbildung sind exemplarisch mit den *GTDs B* Testerplasmiden und pUbiGUS transformierte Skutella nach dem histochemischen GUS Assay dargestellt.

Im Tabellenteil der Abbildung sind die Ergebnisse der Versuche zusammengefasst. In der linken Spalte aufgeführt ist die Spleißakzeptorstelle, die für die GUS Synthese aktiviert werden muss, in der nächsten Spalte das entsprechende Testerplasmid. Zu jedem dieser Testerplasmide sind die Anzahl der Experimente (Exp.), der transformierten Skutella, die erhaltenen GUS Signale, deren Verhältnis zu den als internen Standard verwendeten Anthocyan-Signalen sowie die daraus ermittelte relative Aktivität zu pUbiGUS dargestellt.



B

	A1	A2	A3
GTDsA	0,01927	0,00006	0
GTDsB	0,53485	0,04768	0,04355
GTDsA/B	0,03603	0,00117	0
B aktiver:	27,75793	852,32450	nd
A2/A1	A3/A2	A3/A1	A2/A3
0,00290	nd	nd	nd
0,08914	0,91349	0,08143	1,09471

Abbildung 13: **Ergebnisse der Introntester**

Teil A der Abbildung zeigt die graphische Darstellung der relativen Aktivität der Introntestkonstrukte. Blau dargestellt ist die Aktivität bei Benutzung der Spleißstelle A1, rot A2 und gelb A3. Die Pfeile mit den Zahlen zwischen den einzelnen Balken zeigen die relative Aktivität der einzelnen Balken zueinander.

In Teil B zu sehen ist eine Tabelle mit Vergleichen zwischen der Aktivität der *GTDs A* und *B* Introntester. Dabei sind ganz oben die relativen Aktivitäten angegeben, in der Mitte ein Vergleich zwischen *GTDs A* und *B*. Ganz unten werden die relativen Aktivitäten der Spleißstellen der einzelnen Elemente zueinander gezeigt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Nutzung der 3A-Site von *GTDs B* in der gewählten Testumgebung effizienter ist als die Nutzung der 3A-Site von *GTDs A*. Für beide Elemente gilt, dass innerhalb der 3A-Site A1 am häufigsten, dann A2 und A3 benutzt wird.

Die erzielten Ergebnisse bestätigen die Erwartung, dass *GTDs B* in Vergleich zu *GTDs A* verbessert werden konnte, sowohl in Hinsicht auf eine häufigere Nutzung der 3A Spleißstellen insgesamt, als auch auf eine deutliche Verbesserung in der Nutzung der Spleißstellen A2 und A3.

3.3 Untersuchungen zur Transposition von *GTDs* in Gerste

Eine Voraussetzung zum Einsatz von *GTDs* in einem Zwei Komponenten Tagging System ist, dass das Element von der *Ac*-Transposase *trans*-aktiviert wird und eine Transposition in eine neue genomische Position stattfindet. Die Möglichkeit, durch Segregation die Transposase in Nachkommenlinien zu entfernen, bietet den Vorteil, das *GTDs* Element an seiner genomischen Position stabilisieren zu können. Damit kann eine durch die Transposition des Elementes an eine bestimmte genomische Position hervorgerufene Expression des Reportergens stabilisiert werden, eine Korrelation zwischen der genomischen Position des Elementes und der Expression wird dadurch möglich. Die Transposition findet in zwei Teilschritten statt, die Exzission des Elementes aus seiner genomischen Position, und die Integration an einer neuen Position. Beide Vorgänge können experimentell überprüft werden. In Abschnitt 3.3.2 wurden mit Hilfe einer PCR Methode durch eine Exzission verursachte "leere" Donorstellen nachgewiesen, und unter 3.3.3 mit Hilfe von Southern-Blot Analysen Hinweise auf Transposition an neue genomische Positionen. Da *GTDs* ein Transposase abhängiges Element ist, muß die *Ac*-Transposase (*Ac*-TPase) zur Verfügung gestellt werden. In der Sequenz des hier eingesetzten *Ac*-TPase-Genkonstruktes *Ac* Δ 102 sind im 5' Bereich 412 bp deletiert. Dies bewirkt in *Petunien*protoplasten (Houba-Herlin et al. 1990) und transgenem Tabak (Kunze et al. 1995) eine erhöhte Transpositionsfrequenz. Dabei wird für das *Ac*-Transposon eine inhärente Präferenz für die Transposition in Gensequenzen und in die Nähe seines ursprünglichen Integrationsortes beschrieben (zur Übersicht Kunze et al. (1997)). In diesem System wurde die *Ac*-TPase durch Kreuzen von *Ac*-TPase exprimierenden Linien mit *GTDs* Linien bereitgestellt.

3.3.1 Identifizierung von Pflanzen mit *GTDs* und *Ac*-TPase Konstrukten

Nach einer Kreuzung von *GTDs* Linien mit Transposase exprimierenden Linien (*cwAc* Δ 102) (2.1.7) kann eine Transposition von *GTDs* in den Nachkommen erfolgen, die beide Konstrukte geerbt haben. Zur Etablierung von F1 Linien, die das *GTDs* Element und das *cwAc* Δ 102 Konstrukt enthalten, wurden fünf *GTDs* Linien (2.1.7) mit drei *Ac*-TPase exprimierenden Linien (2.1.7) gekreuzt. Die entstandenen F1 Linien wurden zunächst auf das Vorhandensein beider Konstrukte untersucht.

Dafür wurde genomische DNA der F1 Linien mit Hilfe einer Multiplex PCR Testmethode auf

Tabelle 1: Übersicht über die erfolgreichen Kreuzungen

<i>GTDs A</i>	<i>cw</i>	Anzahl der F1 Pflanzen
1	3	1
2	2	16
2	4	3
3	2	4
4	2	4
4	4	1
5	4	1

diese beiden Konstrukte hin analysiert (2.2.10). Dabei wurden spezifisch Sequenzen der *GTDs* und *cwAcΔ102* Konstrukte amplifiziert, sowie eine Sequenz aus dem Gersten-eigenen *waxy* Gen. Drei Primerpaare wurden in der PCR verwendet, jeweils ein Paar (*cw1* und *cw2* bzw. *GTDs1* und *GTDs2* (2.1.10)) amplifizierten dabei spezifisch einen Bereich des Transposase-exprimierenden Konstruktes bzw. des *GTDs* Elementes. Das dritte Primerpaar (*hwaxy1* und *hwaxy2* (2.1.10)) wurde zur Amplifikation eines internen Standards genutzt. Eine gleichzeitige Amplifizierung einer *waxy* spezifischen Sequenz und der Konstrukt spezifischen Sequenzen erlaubt die eindeutige Identifizierung von Pflanzen, die weder *cwAcΔ102* noch *GTDs* enthalten. Eine Nicht-Amplifizierung aufgrund technischer Probleme kann so ausgeschlossen werden, wenn das *waxy* Amplifikat nachweisbar ist. Die entstandenen Amplifikate sind exemplarisch in Abbildung 14 dargestellt. Dabei sind die Amplifikate von *waxy* (600bp) *GTDs* (419bp) und *cwAcΔ102* (320bp) anhand ihrer unterschiedlichen Größe deutlich zu unterscheiden. Um die Identität der spezifischen Amplifikate zu prüfen, wurden alle drei resultierenden Banden mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (2.1.2) kloniert und sequenziert (2.1.4). Die für jedes Amplifikat erhaltenen Sequenzen stimmten mit den jeweiligen Sequenzen der Konstrukte bzw. des *waxy* Gens überein. Damit wurde gezeigt, dass die erhaltenen Amplifikate spezifisch sind und die Methode somit zur Analyse der Linien angewendet werden kann. Mit dieser Methode wurden aus den Kreuzungen erhaltene F1 Pflanzen untersucht. In Tabelle 1 sind die Pflanzen, welche beide Konstrukte enthalten, zusammengestellt. Dabei wurden für die Linien *GTDs* 1 bis *GTDs* 5 Kreuzungen mit den *cwAcΔ102* Linien 2,3 und 4 erhalten.

3.3.2 Exzission von *GTDs*

Ein Teilschritt bei der Transposition des *GTDs* Elementes ist die Exzission aus der ursprünglichen genomischen Position. Bei der Exzission kann es zu Deletionen oder Basenveränderungen in den Sequenzen 5' und 3' des Exzissionsortes kommen (Sutton et al. 1984; Fedoroff 1989; Baran et al. 1992; Scott et al. 1996). Diese "Footprint" genannte Veränderung ist ein Charakteristikum der Exzission. Der Nachweis der Exzission gibt einen experimentellen Hinweis auf Transposition eines Elementes, dieser kann über die Amplifikation "leerer" Donorstellen erfolgen. Hier wird ein Nachweis von Exzission aus der ursprünglichen Position dadurch ermöglicht,

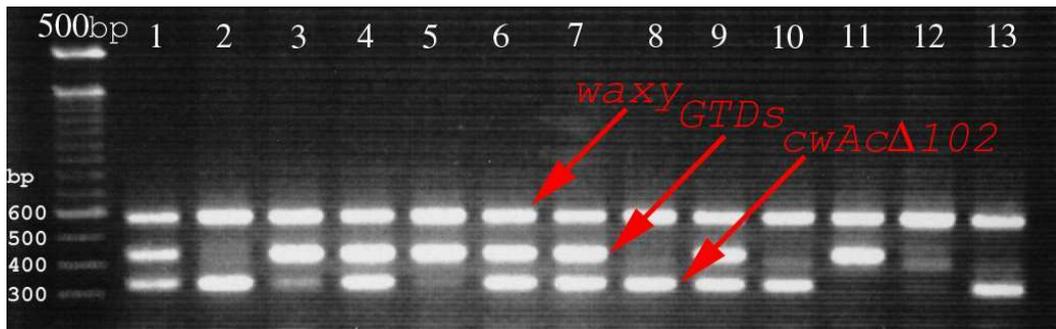


Abbildung 14: **Ergebnisse einer *cwAcΔ102*/*GTDs* Multiplex PCR**

Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte auf einem 2% Agarosegel. In allen Proben (1-13) ist das als interne Kontrolle amplifizierte Fragment des *waxy* Gens mit einer Größe von 600bp zu erkennen (roter Pfeil "*waxy*"). Zusätzlich findet sich bei einigen Proben das *GTDs* spezifische Fragment bei 419bp und das *cwAcΔ102* spezifische bei 320bp (rote Pfeile "*GTDs*" und "*cwAcΔ102*").

dass das *GTDs* Element an seinem primären Integrationsort von Sequenzen des Transformationsvektors flankiert ist. Da diese Sequenzen bekannt sind, lassen sich Primer ableiten, mit denen sich spezifische Fragmente amplifizieren lassen, wenn *GTDs* sich nicht mehr an diesem Integrationsort des Transformationskonstruktes befindet (Abbildung 15). Dabei werden die Primer möglichst nahe an die 5' und 3' Grenze des *GTDs* Elementes gesetzt, da die Länge der Integration des Transformationsvektors nicht bekannt ist und bei jeder unabhängig transformierten Linie variiert. Mit Hilfe dieser so genannten "Footprint" PCR (2.2.9) können die "leeren" Donorstellen amplifiziert und nachgewiesen werden. Als interner Standard wurde wiederum ein Fragment des endogenen *waxy*-Gens amplifiziert. Um die Spezifität der "Footprint" PCR zu prüfen, wurde eine "Footprint" PCR mit DNA aus Blattmaterial einer *cw4* x *GTDs A 5* Pflanze durchgeführt. Das PCR Produkt wurde subkloniert und sequenziert (2.1.4), um die Identität des Amplifikates eindeutig zu klären und die Methode so zu validieren. Es wurden zwei unterschiedliche "Footprints" gefunden, die in Abbildung 15 dargestellt sind.

Die sequenzierten PCR-Produkte zeigen die Vektorsequenzen nach einer Exzision von *GTDs*. In den beiden Sequenzen sind typische Basenveränderungen zu sehen (Zur Übersicht: Fedoroff (1989)). Dabei wird in der Footprint Sequenz 1 (siehe Abbildung 15) ein GC-GG zu GG-CG, es werden somit zwei Basen invertiert. In Sequenz 2 wird das GC-GG zu GC-CG, hier also nur eine invertierte Base. Eine Exzision von *GTDs A* ist damit eindeutig nachgewiesen, und gibt erste Hinweise auf eine Transposition in Gerste.

3.3.3 Transposition von *GTDs*

F2 Pflanzen, bei denen sich das *GTDs* Element nach einer Transposition in der F1 Generation an einer neuen genomischen Position befindet, wurden identifiziert. Die Identifizierung neuer Integrationsorte erfolgt über eine Southern-Blot Analyse mit einer *GTDs* spezifischen Sonde (2.2.4). Neue Hybridisierungsmuster deuten dabei auf eine neue genomische Position

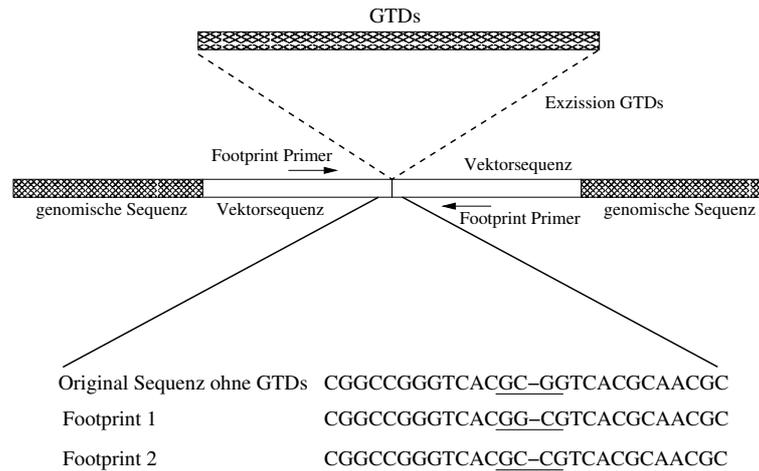


Abbildung 15: Schematische Darstellung der *GTDs* Exzission und der identifizierten Footprint Sequenzen

Im oberen Teil der Abbildung ist die Sequenzumgebung eines Exzissionsorts von *GTDs* (schraffierte Box) schematisch dargestellt. Die Exzissionsstelle ist von der Sequenz des Transformationsvektors (ungefüllte Boxen) flankiert, diese wiederum von unbekanntem genomischen Sequenzen (eng schraffierte Boxen). Hier wurden für die Vektorsequenzen spezifische Primer (Pfeile) für eine PCR eingesetzt. Im unteren Teil der Abbildung sind die identifizierten "Footprint" Sequenzen dargestellt. Unter der unveränderten Originalsequenz sind die beiden Footprint Sequenzen 1 und 2 abgebildet. Die Abweichungen sind unterstrichen, "-" symbolisiert den Exzissionsort.

und damit auf ein Transpositionsereignis hin. Transpositionsereignisse von *Ac* in Gerste in der F1 Generation sind bisher mit einer Frequenz von 1 bis 2 % beschrieben (Koprek et al. 2000; Scholz et al. 2001), daher ist eine Untersuchung größerer Populationen erforderlich. Da eine Southern-Blot Analyse von mehr als 100 Pflanzen sehr aufwendig ist, ist eine Vorselektion solcher Pflanzen, bei denen eine Transposition wahrscheinlich stattgefunden hat, von Vorteil. Bei F2 Pflanzen, die durch Segregation ihr Transposase exprimierendes Konstrukt verloren haben und ein Exzissionsereignis zeigen, muss ein Transpositionsereignis in einer früheren Generation stattgefunden haben.

In der F2-Generation steht auch eine größere Anzahl von Pflanzen zur Untersuchung zur Verfügung, dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, Transpositionsereignisse zu detektieren. Das Vorkommen des *GTDs* Elementes und des *Ac*-TPase-exprimierenden Konstruktes wurde mit Hilfe der Multiplex-PCR Technik geprüft (2.2.10). Insgesamt wurden dabei 166 F2 Pflanzen getestet, davon enthielten 88 Pflanzen (53,0%) beide Elemente, 38 (22,9%) nur *GTDs*, 27 (16,3%) nur *cwAcΔ102* und 13 (7,8%) keines der Elemente mehr. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Da eine Exzission ein Hinweis auf eine Transposition ist, wurde mit DNA dieser F2 Pflanzen eine "Footprint" PCR durchgeführt (3.3.2), um Exzissionen von *GTDs* aus dem primären Integrationsort nachzuweisen. Von den 38 Pflanzen, welche nur noch *GTDs* enthalten, wurden in der "Footprint" PCR 28 identifiziert, die eine Exzission zeigen. Diese Pflanzen sind Kandidaten für eine Analyse per Southern-Blot (2.2.4), die Zahl der zu untersuchenden Pflanzen konnte

Tabelle 2: Übersicht F2 Pflanzen

<i>GTDs A</i>	<i>cwAcΔ102</i>	gesamt	<i>GTDs und cwAcΔ102</i>	nur <i>GTDs</i>	nur <i>cwAcΔ102</i>	kein Element
2	2	65	23	22	12	8
2	4	5	5	0	0	0
3	2	52	35	7	7	3
4	2	21	8	8	5	0
5	4	23	17	1	3	2
gesamt		166	88	38	27	13

mit dieser Strategie von 166 auf 28 reduziert werden.

Um neue Hybridisierungsmuster zu identifizieren, wurde genomische DNA der 28 Pflanzen mit dem Restriktionsenzym *BamHI* (2.1.5), welches eine Erkennungsstelle im *GTDs* Element besitzt, geschnitten. Der zweite *BamHI* Schnitt liegt an einer zufälligen Stelle im Genom. Die restringierte DNA wurde in einer Southern-Blot Analyse mit einer *GTDs* Element spezifischen Digoxigenin markierten Sonde eingesetzt (2.2.4). Um neue *GTDs* spezifische Fragmente identifizieren zu können, wurde als Referenz DNA der *GTDs* und *cwAcΔ102* Elternpflanzen verwendet. Neue DNA Fragmente entsprechen Integrationen von *GTDs* an einer neuen genomischen Position.

Zwei der 28 untersuchten Pflanzen, 20C2 und 22B3, zeigten bei der Restriktion mit *BamHI* neue Element-spezifische Hybridisierungssignale. Zwei weitere Pflanzen zeigten ein dem Muster der Pflanze 22B3 entsprechendes neues Muster (22B2, 22B7) und stammen von der gleichen F1 Pflanze. Die 24 anderen untersuchten Pflanzen zeigten kein neues Hybridisierungsmuster.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde die genomische DNA der Pflanzen 20C2 und 22B3 mit weiteren Restriktionsenzymen analysiert. In Analysen zur Expression des Reportergens (3.3.4) zeigten fast alle Nachkommen der Pflanze 20C6 GUS Expression, dies war ein Hinweis auf eine Transposition in der Pflanze 20C6. Daher wurde auch diese Pflanze für die Untersuchung mit weiteren Restriktionsenzymen herangezogen. Da die Pflanze 20C6 bei Verwendung des Enzyms *BamHI* kein neues Hybridisierungsmuster zeigte, kann es sich um eine Integration von *GTDs* nahe am Donorlokus des Elementes handeln. Denn dabei ändert sich der Abstand zwischen dem Element und der Position der verwendeten Restriktionsschnittstelle im Genom nur minimal, die Größenänderung des resultierenden Restriktionsfragmentes kann dann unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Eine Transposition von *GTDs* in unmittelbare Nähe der Donorposition ist durchaus möglich, da eine entsprechende Präferenz für *Ac* festgestellt wurde. Viele Reintegrationen wurden in nur 6 bp bis 15 kb Entfernung des Donorlokus nachgewiesen (Dowe et al. 1990; Peterson 1990; Grotewold et al. 1991; Athma et al. 1992; Chen et al. 1992; Moreno et al. 1992; Weil et al. 1992), in *Arabidopsis* finden nach Parinov et al. (1999) 15% der Reintegrationen in den T-DNA Transformationsvektor statt.

Reintegrationen, die nahe am Donorlokus liegen, lassen sich mit Restriktionsenzymen nachweisen, deren Schnittstelle zwischen dem Donorlokus und dem Lokus der Reintegration liegt.

So entsteht auch bei einer Transposition in einem dem Donorlokus benachbarten Bereich ein Restriktionsfragment, dessen Größe sich deutlich von der ursprünglichen Fragmentgröße unterscheidet, und somit einen Nachweis über eine Southern-Blot Analyse ermöglicht. *ClaI* (2.1.5) liegt in der Sequenz des Transformationsvektors nahe des *GTDs* Elementes und erfüllt damit diese Anforderungen.

Die Southern-Blot Analysen mit jeweils vier Restriktionsenzymen sind in den Abbildungen 16 (20C6), 17 (20C2) und 18 (22B3) zu sehen.

Die Pflanzen 20C2 und 20C6 gehen auf die gleiche F1 Pflanze zurück, eine Kreuzung einer *cw2* mit einer *GTDs* 3 Linie. Die Pflanzen 22B2, 22B3 und 22B7 stammen ebenfalls von einer F1 Pflanze ab, diese entstand aus der Kreuzung einer *cw2* Linie mit einer *GTDs* 4 Linie.

Die Analyse der Pflanze 20C6 (Abbildung 16) zeigt bei den verwendeten Enzymen nur bei *ClaI* ein neues Element-spezifisches Hybridisierungssignal. Dies könnte, wie bereits vermutet, auf eine Transposition in die nächste Umgebung des Donorlokus hinweisen.

Bei der Pflanze 20C2 scheint sich die Zahl der Elemente um mindestens eins zu erhöhen (Abbildung 17). Hier sind bei der Restriktion mit *AvaI*, *BglII* und *BamHI* neue Element-spezifische Hybridisierungssignale zu erkennen, während die Signale der *GTDs* Elternpflanze noch vorhanden sind. Zu einer Erhöhung der Elementzahl kann es kommen, wenn die Transposition während der Replikation in noch nicht replizierte Bereiche stattfindet (Greenblatt 1984; Chen et al. 1987).

Die in Abbildung 18 dargestellte Southern-Blot Analyse der Pflanze 22B3 zeigt bei zwei der vier verwendeten Enzyme, *AvaI* und *BamHI*, neue Element-spezifische Hybridisierungssignale. Bei der Restriktion mit *AvaI* wird ein zusätzliches, neues Signal sichtbar, damit sind sechs Signale zu sehen. Bei Restriktion mit *BamHI* zeigt die *GTDs* 4 Elternpflanze fünf Element-spezifische Hybridisierungssignale, 22B3 zeigt sieben Element-spezifische Hybridisierungssignale. Davon sind drei Signale neu, und vier sind an der gleichen Position wie in der Elternpflanze. Eines der Hybridisierungssignale aus der Elternpflanze ist in 22B3 nicht mehr zu sehen. Dies kann bedeuten, dass das für diese Signal verantwortliche Element seine genomische Position verlassen hat, während die anderen beiden Signale durch eine Erhöhung der Elementzahl zu erklären sind.

In der Southern-Blot Analyse gab es in drei Linien (2,4%) neue Integrationsmuster des *GTDs* Elementes, die möglicherweise durch ein Transpositionseignis entstanden sind. Diese neuen Integrationsmuster geben Hinweise auf eine Transposition von *GTDs* in Gerste. Die gewonnenen Daten sind jedoch nicht eindeutig, daher sind weitere Analysen nötig, um die erhaltenen Hinweise auf eine Transposition abzusichern.

3.3.4 Transpositionsnachweis mittels GUS-Expressions-Analysen

Der Vorteil der Verwendung von *GTDs* besteht unter anderem darin, dass eine Transposition von *GTDs* in ein exprimiertes Gen durch den Nachweis von GUS-Expression identifiziert werden kann. Bisher konnte in transienten Testsystemen die Funktion der Element-spezifischen

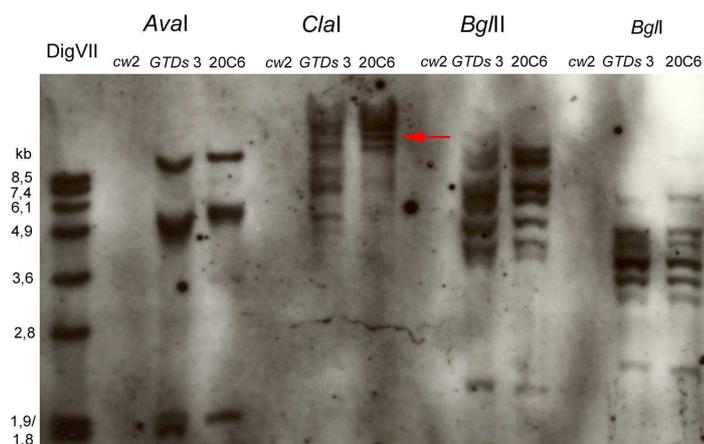


Abbildung 16: **Southern-Blot Analyse der Pflanze 20C6**

Pro Spur wurden 12 μg genomische DNA aus Blattmaterial der Linien *cw 2*, *GTDs 3* und *20C6* nach Restriktion mit den Endonukleasen *AvaI*, *ClaI*, *BglII* und *BglI* auf einem 0,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Die Hybridisierung nach Southern-Blot-Transfer erfolgte mit einem durch PCR Dig-markierten GUS-Fragment. Neue Hybridisierungsmuster werden durch einen roten Pfeil angezeigt.

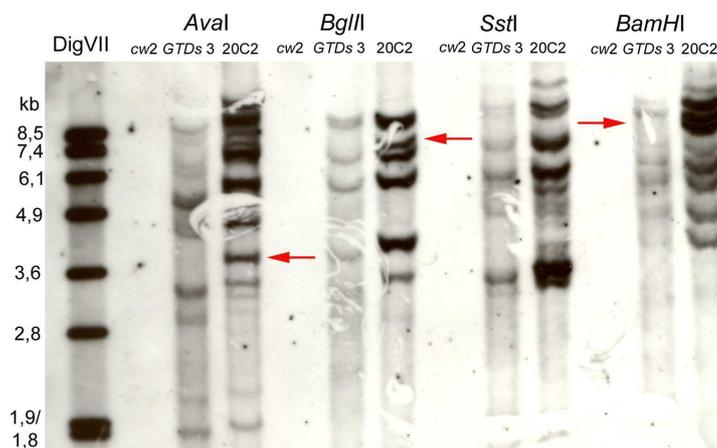


Abbildung 17: **Southern-Blot Analyse von Pflanze 20C2**

Pro Spur wurden 12 μg genomische DNA aus Blattmaterial der Linien *cw 2*, *GTDs 3* und *20C2* nach Restriktion mit den Endonukleasen *AvaI*, *BglII*, *SstI* und *BamHI* auf einem 0,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Die Hybridisierung nach Southern-Blot-Transfer erfolgte mit einem durch PCR Dig-markierten GUS-Fragment. Neue Hybridisierungsmuster werden durch einen roten Pfeil angezeigt.

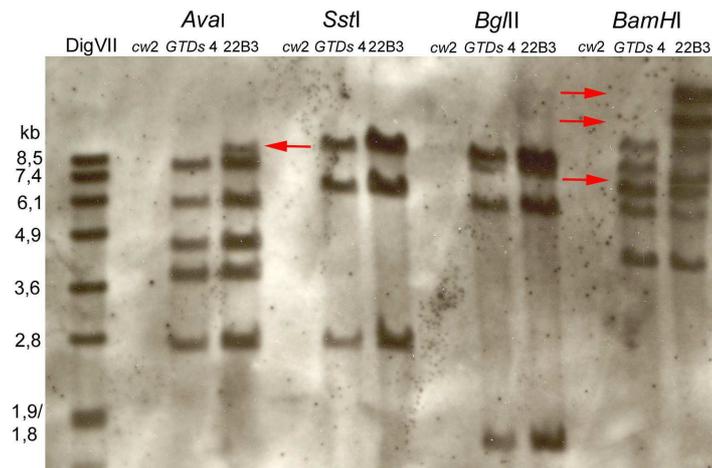


Abbildung 18: **Southern-Blot Analyse von Pflanze 22B3**

Pro Spur wurden 12 μg genomische DNA aus Blattmaterial der Linien *cw 2*, *GTDs 4* und *22B3* nach Restriktion mit den Endonukleasen *AvaI*, *SstI*, *BglII* und *BamHI* auf einem 0,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Die Hybridisierung nach Southern-Blot-Transfer erfolgte mit einem durch PCR Dig-markierten GUS-Fragment. Neue Hybridisierungsmuster werden durch einen roten Pfeil angezeigt.

Konstruktionsmerkmale (3A-Site, 4D-Site und *cis*-Elemente für die Spleißstellenerkennung) nachgewiesen (3.2) und per Southern-Blot (3.3.3) und "Footprint" Analysen (3.3.2) Hinweise auf die Transposition von *GTDs* in Gerste gefunden werden. Für den Einsatz von *GTDs* müssen nun noch die Fragen geklärt werden, ob sich in Gerste Transpositionereignisse, in denen die Transposition von *GTDs* zur Expression des Reportergens führt, nachweisen lassen, und wie groß die dafür zu untersuchende Population sein muß. Ziel dieser Experimente ist es, erste Hinweise zu Klärung dieser Fragen zu erlangen.

Die Expression von GUS Fusionsprotein ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dies sind besonders die Stärke des Promotors des Wirtsgens, in das *GTDs* integriert ist, und die Stabilität der mRNA. Auch der Leserahmen im Bezug auf das Wirtsgen und somit die *GTDs* Spleißstellen, deren Benutzung zu einem funktionalen Fusionsprotein führen, hat einen starken Einfluß, da nach den Ergebnissen der unter 3.2 gezeigten Versuche nicht alle Spleißstellen mit gleicher Häufigkeit verwendet werden.

Im folgenden wurde, unter Verwendung verschiedener Annahmen, zunächst die für eine Untersuchung nötige Populationsgröße berechnet.

3.3.4.1 Theoretische Vorüberlegungen zum Transpositionsachweis mittels GUS-Expressionsanalysen

Die Untersuchung hat zum Ziel, die Möglichkeit des Transpositionsachweises über eine GUS-Expressionsanalyse zu ermitteln. Für die Untersuchung erscheint es sinnvoll, ein Entwicklungsstadium der Pflanze zu verwenden, in dem viele Gene exprimiert werden. Bei einer hohen Zahl von exprimierten Genen steigt die Wahrscheinlichkeit, dass sich darunter ein Gen befindet, in

das eine Transposition von *GTDs* stattgefunden hat. Frühe Stadien der Keimlings-Entwicklung entsprechen diesen Anforderungen und wurden daher eingesetzt. Weitere Vorteile bei der Verwendung von Keimlingen sind, dass aufgrund der geringen Größe der komplette Keimling in einem GUS Assay untersucht werden kann, und eine große Zahl von Keimlingen angezogen und getestet werden können. Das Gewebe wurde 48h nach der Keimung für den GUS Assay verwendet, die Keimlinge befinden sich dann in der Phase III der Keimung (Bewley 1997). Dieses Keimlingsstadium wurde ausgewählt, weil in diesem Stadium die Proteinsynthese seit mindestens 24h stattfindet. Dadurch konnte sich GUS anreichern, das nach Jefferson (1987) eine Halbwertszeit von etwa 50h besitzt.

Vor Durchführung der Analysen ist es hilfreich zu wissen, wie groß die zu untersuchende Population mindestens sein muss, um eine GUS-Expression nachzuweisen. Hierauf haben eine Anzahl verschiedener Parameter Einfluß, deren Größen aber nur näherungsweise bekannt sind. Die wichtigsten dieser Faktoren sind die Anzahl der Nachkommenpflanzen, die ein Transpositionsereignis zeigen können, die Transpositionsrate und die Anzahl der Pflanzen, welche eine GUS-Expression zeigen. Hinweise zu einigen dieser Parameter finden sich bei Sundaesan et al. (1995) für *Arabidopsis*, Chin et al. (1999) und Greco et al. (2001) für Reis und Koprek et al. (2000) für Gerste. Die Zahlen wurden verwendet, um einen Bezug für einen Vergleich zu haben.

Eine mögliche Populationsgröße wurde unter Verwendung von verschiedenen Annahmen errechnet. Dabei wurden in einer Rechnung die höchsten Werte aus der Literatur zugrunde gelegt und in einer zweiten die niedrigsten Werte mit einer zusätzlichen Sicherheitsmarge verwendet. Als erstes wurde errechnet, wie viele Pflanzen der Population überhaupt Transpositionsereignisse haben können, da ein bestimmter Teil der Nachkommen durch Segregation das *GTDs* Element verliert. Für die Berechnung muß zuerst bestimmt werden, ob eine unabhängige Vererbung des *GTDs* Elementes und des *Tranposasegens* vorliegt. Wenn dies der Fall ist, läßt sich für die Folgegeneration bestimmen, wie viele Pflanzen durch Segregation *GTDs* oder *cwAcΔ102* verlieren. Dies ist ein wichtiger Faktor für die Berechnung der benötigten Populationsgröße. Da für die Untersuchung F3 Nachkommen der in Tabelle 2 zusammengestellten F2 Pflanzen Verwendung finden, können die Daten der 166 F2 Pflanzen für die Untersuchung der Vererbung herangezogen werden. Es wird für die Pflanzen eine unabhängige Vererbung der beiden Komponenten angenommen, es würde sich demnach nach der dritten Mendelschen Regel eine Aufspaltung von 9:3:3:1 (*cwAcΔ102/GTDs* : *GTDs/-* : *cwAcΔ102/-* : *-/-*) ergeben. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde ein χ^2 Test durchgeführt.

$$\chi^2 = \sum \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{(B_{beide} - E_{beide})^2}{E_{beide}} + \frac{(B_{GTDs} - E_{GTDs})^2}{E_{GTDs}} + \frac{(B_{cwAc\Delta 102} - E_{cwAc\Delta 102})^2}{E_{cwAc\Delta 102}} + \frac{(B_{kein} - E_{kein})^2}{E_{kein}} = \frac{(88-93,4)^2}{93,4} + \frac{(38-31,1)^2}{31,1} + \frac{(27-31,1)^2}{31,1} + \frac{(13-10,4)^2}{10,4} = 3,03$$

Dabei ist E der erwartete Wert für das Merkmal (Vorkommen von *GTDs* und *cwAcΔ102* im Genom) und B der tatsächlich beobachtete. Die einzelnen Werte für die Berechnung sind in der Formel dargestellt, die Summe der χ^2 Werte ergibt 3,03. Bei drei Freiheitsgraden entspricht ein χ^2 von 3,03 einer Wahrscheinlichkeit P zwischen 0,5 und 0,3. Damit ist der Wert als statistisch

signifikant anzusehen und eine unabhängige Aufspaltung anzunehmen. Bei heterozygoten Eltern würde damit folgendes gelten: 18,75% der F3 Pflanzen besitzen kein *GTDs* mehr, 18,75% kein *cwAcΔ102*. Das bedeutet, 56,25% der untersuchten Pflanzen enthalten noch beide Komponenten des Systems, eine Transposition kann stattfinden. In 6,25% findet sich keines der beiden Elemente mehr. In den 18,75% der Pflanzen, die nur noch *GTDs* enthalten, ist somit nur ein Ereignis zu detektieren, das sich aus einer früheren Generation vererbt hat. Damit besteht in 75% der Nachkommen die Möglichkeit, Transpositionsereignisse und damit gekoppelt möglicherweise die Expression des GUS Markers zu detektieren, 25% der Nachkommen können keine Transpositionsereignisse enthalten.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Transpositionsrate der Elemente. Diese liegt nach Sundaesan et al. (1995) bei 80% in *Arabidopsis*, für Reis F2 Linien bei 15-50% (Greco et al. 2001) und in Gerste F2 Linien bei 0-47% (Koprek et al. 2000). Hier werden die in den monokotylen Pflanzen ermittelten Werte für die Transpositionsrate verwendet, als Maximum 50%, als Minimum 15%.

Der letzte Faktor für die Abschätzung ist der Prozentsatz der Pflanzen, die nach einer Transposition GUS-Expression zeigen. Dafür geben Sundaesan et al. (1995) 26% für *Arabidopsis* und Chin et al. (1999) 8% für Reis an. Es findet hier jedoch keine Selektion auf entfernte Transpositionen statt, wie bei dem von Sundaesan et al. (1995) und Chin et al. (1999) benutzten System, daher ist mit einer geringeren Rate zu rechnen. Aus diesem Grund wird für die Maximalrechnung der Wert aus dem monokotylen System mit 8% benutzt und für die Minimalrechnung 4% angenommen.

Die Berechnung kann damit nach der Formel:

$\frac{1}{\text{NachSegregation}} * 100 * \frac{1}{\% \text{Transpositionsrate}} * 100 * \frac{1}{\% \text{derGUSEreignisse}} * 100$ durchgeführt werden.

Maximalrechnung: $\frac{1}{75} * \frac{1}{50} * \frac{1}{8} * 100^3 = 33,4$ (Transpositionsrate 50% (Maximum nach Koprek et al. (2001)), 8 % der Pflanzen zeigen GUS (Reis nach Chin et al. (1999))

Minimalrechnung: $\frac{1}{75} * \frac{1}{15} * \frac{1}{4} * 100^3 = 222,2$ (Transpositionsrate 15% (Minimum nach Greco et al. (2001)), 4% der Pflanzen zeigen GUS (Schätzung))

Somit variiert die Zahl der Pflanzen, die man untersuchen muss, um ein Transpositionsereignis nachweisen zu können. Je nachdem welche Werte man für die verschiedenen Faktoren zugrundelegt, von 34 (Maximalrechnung) bis 223 (Minimalrechnung). Der Wert für die ungünstigsten Annahmen wurde zur Abschätzung der folgenden Untersuchung von F3 Keimlingen verwendet.

3.3.4.2 GUS-Expressionsanalysen in "F3 Keimlingen"

Insgesamt wurden 1592 Keimlinge, die auf 90 F1 Linien zurückgeführt werden können, auf GUS-Expression untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Als besonders interessant erwies sich dabei die Linie 20C6, eine *GTDs* 3 x cw 2 Linie. Dort zeigten 24 von 25 F3 Keimlingen eine starke GUS-Expression, Bilder dazu sind in Abbildung 19 (20C6) zu sehen. Da die Expression in fast allen Keimlingen auftritt und ein einheitliches Muster zeigt, muss das Transpositionsereignis schon in der F1 oder F2 Generation stattgefunden haben. Ein mögliches Transpositionsereignis, ein "Footprint" nach einer Exzision und

Tabelle 3: Übersicht über die untersuchten F3 Linien

<i>GTDs</i>	<i>cwAcΔ102</i>	<i>GTDs</i> Kopienzahl	F2- Linien	F3-- Keimlinge	F3 mit GUS-Expression	GUS / Keimling	% GUS-Expression
2	2	3	29	588	9	0,0153	1,53
2	4	3	5	76	1	0,0132	1,32
3	2	6	33	498	4	0,008	0,8
4	2	5	9	189	3	0,0159	1,59
5	4	2	13	216	1	0,0046	0,46
			89	1567	18	0,0114	
3 (20C6)	2	6	1	25	24		
<i>GTDs</i>	<i>cwAcΔ102</i>	<i>GTDs</i> Kopienzahl		F1-Keimlinge	F1 mit GUS-Expression		
2	-	3		32	-		
3	-	6		22	-		
4	-	5		24	-		
5	-	2		33	-		

ein neues Hybridisierungssignal in einer Southern-Blot Analyse, konnte für diese Linie bei der Untersuchung der Transposition von *GTDs* festgestellt werden (3.3.3).

Bei 18 weiteren F3 - Keimlingen zeigte sich eine GUS-Expression. Eine Auswahl von Expressionsmustern von fünf dieser Keimlinge ist in Abbildung 19 zusammengestellt. Die Stärke der Expression und das Gewebe, in dem die Expression sichtbar ist, variieren je nach Linie, dies spricht für eine Transposition in unterschiedliche Gene. Bei der Linie 20C6 zeigt sich zum Beispiel die Expression vornehmlich im Leitgewebe, bei 15A1 ist die Expression dagegen in fast allen Teilen des Keimlings sichtbar, und bei 21J7 ist eine deutlich schwächere Expression nachweisbar, die sich auf das Skutellum des Keimlings beschränkt. Bei der Interpretation der Expression ist zu beachten, dass der verwendete Färbepuffer (2.2.7) auf maximale Sensitivität ausgelegt ist, dadurch ist die GUS Färbung jedoch weniger scharf lokalisiert (Sundaresan et al. 1995).

Als Kontrolle ebenfalls auf GUS-Expression untersuchte F1 Keimlinge der *GTDs* Elternpflanzen zeigten keinerlei GUS-Expression. Es wurde damit ein GUS exprimierender auf 87 untersuchte Keimlinge gefunden, dieser Wert liegt innerhalb des in der Abschätzung berechneten Wertebereiches (34 - 223).

In der Anzahl der F3 Pflanzen pro Linie, die eine GUS-Expression zeigen, sind deutliche Unterschiede festzustellen (Tabelle 3). In der Linie *GTDs* 5 x cw 4 zeigte nur eine der F3 Pflanzen eine GUS-Expression (0,0046), die Linien *GTDs* 2 x cw 2, *GTDs* 2 x cw 4 sowie *GTDs* 4 x cw 2 zeigen alle ein ähnliches Auftreten von GUS-Expression (zwischen 0,013 und 0,016), in der Linie *GTDs* 3 x cw 2 dagegen treten nur etwas mehr als halb so viele Signale auf (0,008).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass bei der Untersuchung von 1592 F3 Pflanzen, die auf 90 F2 Linien zurückgeführt werden können, 19 unabhängige GUS-Expressionsereignisse nachgewiesen werden konnten (1,19%), die auf eine Transposition von *GTDs A* in ein exprimiertes Gen hindeuten.



Abbildung 19: **GUS-Expression in F3 Keimlingen**

Auswahl der erhaltenen GUS-Expressionsmuster in den untersuchten Keimlingen. Bilder der gleichen Pflanze sind mit einer Box gleicher Schattierung unterlegt. Darstellung Aufsicht und/oder Querschnitt der Keimlinge.

4 Diskussion

Gene-Trap Elemente haben sich in Pflanzen als nützliche Hilfsmittel erwiesen, bis heute konnten mit ihrer Hilfe bereits eine Anzahl von Genen kloniert und charakterisiert werden, diese Zahl dürfte sich in Zukunft noch erhöhen. Besonders Gene, die Funktionen in mehreren Organen und Entwicklungsstufen haben, deren Mutation im homozygoten Zustand letal ist, oder redundante Gene lassen sich identifizieren (zur Übersicht Springer (2000)). *Gene-Trap* Elemente ermöglichen über die Expressionsmuster der Wirtsgene die Möglichkeit, eine Brücke zwischen Gensequenz auf der einen Seite und Genfunktion und Regulation auf der anderen Seite zu schlagen.

Das *Ac*-Transposon eignet sich auch in heterologen Systemen, wie von Sundaresan et al. (1995) für *Arabidopsis* und Chin et al. (1999) für Reis festgestellt wurde, als Basis für ein *Gene-Trap* System. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass das ebenfalls auf *Ac* basierende *GTDs* von den Transpositionseigenschaften her in Gerste einsetzbar ist.

GTDs B wurde für den Einsatz in monokotylen Pflanzen optimiert, indem die *cis*-wirksamen Spleißsignale im Intron und den Spleißakzeptorstellen von *GTDs B* zuerst nach theoretischen Erkenntnissen verändert und *in-silico* mit dem Programm "Splice predictor" (Brendel und Kleffe 1998) geprüft worden sind. Nach der Prüfung wurde die Optimierungsstrategie umgesetzt und die Optimierungen in Gerste getestet.

Für den Einsatz in einem *Gene-Trap* System sind die Transposition und die Nutzung der künstlichen Spleißstellen in *GTDs* notwendig. Da die Optimierung von *GTDs* besonders im Hinblick auf eine Nutzung der Spleißstellen erfolgte, lag der Schwerpunkt der Untersuchung auf dem Nachweis von Spleißvorgängen. Für diese Untersuchungen wurden möglichst realitätsnahe Testsysteme entwickelt.

4.1 Optimierung der *cis*-aktiven Spleißsignale in *GTDs B*

Gene-Trap Elemente enthalten ein Reporterogen, dessen Transkription von der Expression des chromosomalen Wirtsgens abhängt, in welches das *Gene-Trap* Element inseriert ist. Dadurch läßt sich die Aktivität des Wirtsgens in der einzelnen Zelle untersuchen. Eine Voraussetzung dafür ist die Synthese eines Reportergenproduktes, dessen Menge den Schwellenwert für eine Detektion erreicht. Verschiedene Konstruktionsmerkmale des *Gene-Trap* Elementes sollen dies ermöglichen, dabei spielt die Verwendung einer Intronsequenz, die in *cis* wirkende Strukturmerkmale zur Erkennung von Spleißakzeptorstellen bereitstellt, mit mehreren Spleißakzeptorstellen vor dem Reporterogen eine besondere Rolle.

Das Reporterogen eines *Gene-Trap* Elementes kann in drei unterschiedlichen Leserahmen im Verhältnis zum Wirtsgen integrieren. Befindet sich nur eine Spleißakzeptorstelle vor dem Reporterogen, so führen nur die Integrationen in einem der drei Leserahmen zu einem funktionalen Reporterenzym. Dieser Ansatz wird zum Beispiel von Hiwatashi et al. (2001) in *Physcomitrella patens* und Bechtold et al. (1993) in *Arabidopsis* verwendet. Durch die Benutzung nur einer

Spleißakzeptorstelle findet dort ein effektives Spleißen statt, ein deutlicher Nachteil dieser Strategie ist dabei, dass statistisch gesehen bei nur 1/3 der Insertionen das Reporter-gen des Elementes im dem Leserahmen liegt, der zu einer Expression führt. Daraus resultiert eine höhere Anzahl an Pflanzen, die erzeugt und untersucht werden müssen.

Die hier verfolgte Strategie setzt eine Intronsequenz mit einer dreifachen Spleißakzeptorstelle (3A-Site) vor das GUS Reporter-gen. Die Aktivierung jeder dieser drei Spleißstellen führt zu einer transkriptionalen Wirtsgen:GUS Fusion in einem anderen Leserahmen, die Wahrscheinlichkeit für die Synthese von GUS steigt damit (Abbildung 1, Seite 4).

Experimente mit *Gene-Trap* Systemen in Maus (Gossler et al. 1989; Skarnes et al. 1992) zeigten, dass eine oder mehrere Spleißakzeptorstellen vor dem Reporter-gen die Frequenz der Insertionen, die in einem Nachweis des Reporter-gens resultieren, 10 bis 100 fach erhöhen. Eine neuere Studie in Reis (Jeon et al. 2000) hatte zum Ergebnis, dass die Effizienz der GUS-Expression bei transgenen Linien, welche ein Konstrukt mit dem dritten Intron des *OsTubA1* α -Tubulin Gens aus Reis mit drei putativen Spleißdonor- und Akzeptorstellen gefolgt von dem GUS Reporter-gen trugen, im Vergleich zu Linien ohne die Spleißstellen und das Intron vor dem GUS-Gen, verdoppelt wurde. Eine weitere Untersuchung von Nussaume et al. (1995) in *Arabidopsis* kommt sogar zu dem Schluß, dass bei Verwendung einer Intronsequenz mit drei Spleißakzeptorstellen die Anzahl der nachgewiesenen Insertionen von 4 % bei einem *Gene-Trap* System ohne Intron, wie bei Bechtold et al. (1993) eingesetzt, auf 20% bei einem System mit Intron gesteigert wird, dies entspricht einer Verfünffachung. Es kann somit festgestellt werden, dass die Verwendung einer Intronsequenz zu einer deutlichen Verbesserung führt, die sich in einer etwa zwei- bis fünffach gesteigerten Anzahl nachweisbarer GUS-Expressionsereignisse manifestiert.

Da es leichte Unterschiede im Prozessieren von Introns zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen gibt (Simpson und Filipowicz 1996), ist es sinnvoll, die für das *Gene-Trap* System verwendete Intronsequenz mit den *cis*-Elementen dem Zielorganismus anzupassen. So nutzten bereits Sundaresan et al. (1995) und Nussaume et al. (1995) in *Arabidopsis* Intronsequenzen eines dikotylen Gens, Chin et al. (1999) und Jeon et al. (2000) in Reis Intronsequenzen eines monokotylen Gens.

Verschiedene zusammenwirkende *cis*-Elemente beeinflussen die Erkennung des Introns und der Spleißstellen. Bei der Entwicklung des Elementes *GTDs B* wurden Sequenzen des Intron1 des *actin1* Gens aus Reis (McElroy et al. 1990) verwendet. Zusätzlich dazu wurden die im Intron lokalisierten *cis*-Elemente für die Spleißstellenerkennung in monokotylen Pflanzen nach den heutigen Erkenntnissen über die Spleißvorgänge in Pflanzen weiter optimiert. Bisher identifizierte *cis*-Elemente sind ein T-Stretch, die Verzweigungsstelle und der Akzeptorkonsensus der Spleißstellen. Die Rolle von AU reichen Elementen beim Spleißen in Pflanzen ist noch nicht vollständig geklärt, unstrittig ist jedoch eine wichtige Rolle bei der Introndefinition. Von einigen Autoren wird eine positionsunabhängige Wirkung U-reicher Elemente (Baynton et al. 1996; Lorkovic et al. 2000; Brown et al. 2002) postuliert. Simpson et al. (2002) konnten dazu

jedoch deutliche Hinweise auf einen der Funktion in Vertebraten entsprechenden T-Stretch in Pflanzen finden, dieser muss für eine effiziente Funktion ein Minimum an zwei Gruppen von drei oder vier T besitzen, deren Abstand bis zu 6bp betragen kann und 2-5 bp downstream von der Verzweigungsstelle entfernt liegt. Nach Simpson et al. (2000) hat das Vorkommen einer AU reichen Sequenz vor der Verzweigungsstelle eine verbesserte Erkennung des Introns zur Folge. In jedem Fall besitzen pflanzliche Introns einen höheren AT Gehalt als Exons (zur Übersicht Simpson und Filipowicz (1996)). Der AT Gehalt von *GTDs A* in dem Bereich, der bei Integration in eine Intronsequenz als Intron erkannt werden muss (5' Elementgrenze bis A1), beträgt 60,3% , bei *GTDs B* 61,4%. Lässt man dabei die *Ac*-Sequenzen, die in beiden Elementen identisch sind, außer acht, so ist in *GTDs B* mit 56,6% AT zu 53,9% AT in *GTDs A* eine noch stärkere Erhöhung vorgenommen worden. In beiden Elementen finden sich drei T-reiche Sequenzabschnitte, dabei sind diese in *GTDs B* im Gegensatz zu *GTDs A* in enger räumlicher Nähe, und der dritte T-reiche Bereich, welcher als T-Stretch fungieren soll, wurde von 6 nt in *GTDs A* auf 8 nt verlängert (Abbildung 5).

Mit den Optimierungen wurde versucht, eine möglichst stringente Erkennung der 3A-Site Spleißstellen zu erreichen.

4.1.1 Die Spleißakzeptorstelle "A1" wird in *GTDs* präferentiell aktiviert

Damit möglichst bei jeder Insertion von *GTDs* in ein Gen eine zum Nachweis ausreichende Menge an GUS Enzym entsteht, sollte die Aktivierung aller Spleißstellen der 3A-Site optimaler Weise im gleichen Verhältnis erfolgen. Zum Entwurf einer 3A-Site, die diesen Kriterien genügt, müssen die Vorgänge bei der 3' Spleißstellenerkennung in Pflanzen beachtet werden.

Bei der 3' Spleißstellenerkennung wird in Vertebraten und Pflanzen ein "scanning" Mechanismus postuliert (Simpson und Filipowicz 1996). Dabei erkennt das Spleißosom eine spezifische DNA Sequenz im Intron, die als Verzweigungsstelle bei der Bildung der Lariatstruktur verwendet wird. Downstream von dieser Verzweigungsstelle erfolgt eine Selektion des ersten AG Dinukleotids als Spleißakzeptorstelle. Damit spielt die Verzweigungsstelle eine große Rolle bei der Definition der 3' Spleißakzeptorstelle (Simpson et al. 2002). Durch den "scanning" Mechanismus ist eine gleichmäßige Aktivierung aller Spleißstellen der 3A-Site wahrscheinlich nicht zu erreichen. Die Auswahl der Spleißakzeptorstelle ist jedoch nicht immer präzise, mit einer gewissen Frequenz werden auch weiter downstream gelegene Spleißakzeptorstellen verwendet (Hummel et al. 2000). Ziel war es hier, die 3A-Site so zu gestalten, dass A2 und A3 möglichst häufig benutzt werden.

Dabei unterscheiden sich *GTDs A* und *B* im Grad der Optimierung im Vergleich zu der von Sundaesan et al. (1995) vorgestellten 3A-Site. Unterschiede bestehen in der Sequenz der 3A-Site und der Sequenz der Verzweigungsstelle. Die Intronsequenz von *GTDs A* enthält zwei mögliche Verzweigungsstellen, diese weichen in einer bzw. zwei Basen vom Konsensus ab. Bei der Selektion der Spleißakzeptorstellen kann es so zu einer Konkurrenz zwischen beiden putativen Verzweigungsstellen kommen, wird die erste Verzweigungsstelle selektiert, liegt die

Spleißakzeptorstelle A3 mit 45 bp Abstand außerhalb der normalen Entfernung von 20 bis 40 bp (Lorkovic et al. 2000) zwischen Verzweigungsstelle und Akzeptorstelle. Dadurch wird die Nutzung von A3 unwahrscheinlicher. In *GTDs B* wurde eine Verzweigungsstelle mit dem pflanzlichen Konsensus (CTAAT) (Simpson und Filipowicz 1996; Simpson et al. 2002) eingefügt. Nach Simpson et al. (2002) hat der Grad der Übereinstimmung mit dem Konsensus für Verzweigungsstellen einen starken Einfluß auf die Spleißstellenaktivierung. Damit alle Spleißstellen der 3A-Site im für Pflanzen ermittelten Abstand von 20 bis 40 bp (Lorkovic et al. 2000) von der gleichen Verzweigungsstelle liegen, wurden im Vergleich zu der von Sundaresan et al. (1995) vorgestellten 3A-Site die Abstände zwischen den einzelnen Spleißstellen von elf Basen auf nur acht (*GTDs A*) bzw. sieben (*GTDs B*) verringert. Bei *GTDs B* ist mit sieben Basen der Minimalabstand erreicht, der bei Erhaltung des weiteren Konsensus für die Spleißakzeptorstellen (Simpson und Filipowicz 1996) erzielt werden kann. Damit soll eine häufigere Aktivierung der Spleißstellen A2 und A3 in *GTDs B* erreicht werden.

Für die Effizienz der Erkennung der einzelnen Spleißstellen ist ihre Übereinstimmung mit der Konsensussequenz (Simpson und Filipowicz 1996) von großer Bedeutung. Die Sequenzen für monokotyle und dikotyle Pflanzen unterscheiden sich dabei nur minimal in der dritten Base (+3) upstream der Spleißstelle. Diese ist bei Dikotylen entweder T oder C, bei Monokotylen jedoch fast stets C (Simpson und Filipowicz 1996). Die erste 3' Spleißstelle der 3A-Site (A1) der hier konstruierten *GTDs*-Elemente weicht bei *GTDs A* in der +3 Base von der idealen Konsensussequenz ab, TGTAG/ statt TGCAG/. Die Spleißstellensequenz entspricht dabei der ursprünglichen Sequenz des *actin1* Intron, diese wird bei Spleißen in Reis effizient genutzt (McElroy et al. 1991). In *GTDs B* wurde die +5 Base von T nach C verändert (CGCAG/). Die zweite (A2) und dritte (A3) Spleißakzeptorstelle entsprechen bei beiden Elementen vollständig dem weiteren Konsensus (TGTAG/GT). Damit existiert eine leichte Schwächung der Spleißstelle A1 in den *GTDs*-Elementen, um eine stärkere Aktivierung der Spleißstellen A2 und A3 zu erreichen.

Verschiedene bei der Untersuchung der Spleißstellen erzielte Ergebnisse (3.2.1 und 3.2.2) sind konsistent mit der postulierten 3' Spleißstellenerkennung über einen "scanning" Mechanismus. Bei *GTDs A* und *B* liegt eine Präferenz für die Bildung der Spleißprodukte D1A1 und D3A1 (3.2.1, Abbildung 9, Seite 33) vor. Die zur Untersuchung verwendete PCR Methode führt zu einer Verschiebung der Mengenverhältnisse, mengenmäßig stark vertretene DNA Produkte werden im Verhältnis zu anderen Produkten stärker amplifiziert. Die starken D1A1 und D3A1 Signale sind somit auf eine schon in der Ausgangsproben mengenmäßig häufiges Vorkommen dieser Spleißvarianten zurückzuführen. Für das *Gene-Trap* System bedeutet dies, dass mit diesen beiden Spleißprodukten schon zwei unterschiedliche Leserahmen produziert werden in denen GUS-Expression aufgrund einer Wirtsgen:GUS Fusion zu erwarten ist.

Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen Unterschiede zu anderen untersuchten Spleißereignissen in *Gene-Trap* Systemen in *Arabidopsis* und Tabak. Nach Daten von Nussaume et al. (1995) werden dort die Kombinationen D1A2, D3A1, D4A1, D4A2 (Tabak) und D4A1, D4A2 (*Arabidopsis*) präferentiell genutzt.

Bei der Untersuchung zur Erkennung und Aktivierung der 3A-Site, wurde für beide *GTDs* Elemente eine Nutzung von A1, A2 und A3 in abnehmender Stärke festgestellt (*GTDs A* A1 1,9 %; A2 0,005%; A3 0%, *GTDs B* A1 53%; A2 4,7% ; A3 4,3% relative Aktivität (3.2.2)). Diese Ergebnisse erklären sich für beide Elemente aus dem postulierten “*scanning*” Mechanismus. Die für diese Untersuchung eingesetzte Methode ermöglicht eine Quantifizierung der Nutzung einzelner Spleißstellen. Experimentelle Schwankungen und Unterschiede des physiologischen Zustandes des Testgewebes wurden durch Verwendung eines internen Standards ausgeglichen. In Gerste wurden die Transkriptionsfaktoren C1 und R (2.1.8) bereits von McElroy et al. (1997) als interner Standard in transienten Untersuchungen genutzt. So wird eine Standardisierung der einzelnen Transformationsexperimente und damit ein genauer Vergleich zwischen ihnen möglich.

Es zeigt sich bei beiden Elementen eine deutliche Präferenz in der Aktivierung von A1. Inwieweit die Einführung nur einer Konsensus-Verzweigungstelle und die Verringerung des Abstandes der Spleißstellen zueinander zu einer stärkeren Nutzung von A2 und A3 in *GTDs B* geführt hat, läßt sich anhand der Ergebnisse schwer beurteilen. Zwar werden A2 und A3 in *GTDs B* signifikant häufiger benutzt als in *GTDs A*, wo nur für A2 eine minimale Aktivierung nachgewiesen werden konnte, aber in *GTDs B* wird die gesamte 3A-Site stringenter erkannt und damit auch A2 und A3. Indiz für eine Verbesserung in *GTDs B* ist jedoch das Verhältnis der Aktivierung der A1 zur A2 Spleißstelle, bei *GTDs A* wird A1 344x mal häufiger benutzt, bei *GTDs B* nur 11x mal. Dies zeigt eine Verschiebung der Nutzungsfrequenzen zu einer häufigeren Nutzung von A2.

Nussaume et al. (1995) stellt für *Arabidopsis* und Tabak eine gleichmäßige Nutzung von A1 und A2 fest. Dies kann durch die Unterschiede in den Konstruktionsmerkmalen des *Gene-Trap* liegen (3A-Site und Intronsequenz mit den *cis*-Elementen für die Erkennung durch das Spleißosom), auf einen Unterschied in den Spleißmechanismen zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen hinweisen, oder aber durch die eingesetzte Untersuchungsmethode verursacht werden, da sich diese nur sehr eingeschränkt zur Quantifizierung der Ergebnisse eignet.

Die von “Splice predictor” (2.1.3.1, Brendel und Kleffe (1998)) ermittelte zusammenfassende * Bewertung für A1, A2 und A3 von *GTDs A* von 4, 13, 11 und *GTDs B* mit 12,11,11 stimmt in der Einschätzung der Nutzung von A1 mit den beobachteten Werten überein, A1 von *GTDs A* wird signifikant weniger benutzt als A1 von *GTDs B*. Die Bewertung von A2 und A3 hingegen stimmt für *GTDs A* jedoch nicht mit den beobachteten Ergebnissen überein, für *GTDs B* wird eine 7% weniger häufige Aktivierung berechnet, bei den Versuchen wurde jedoch eine zur Aktivität von A1 um 91,2% (A2) und 91,9 % (A3) geringere Aktivierung festgestellt. Die Abweichung der Beurteilung von A2 und A3 zeigen, dass das *in-silico* Modell für diesen Spezialfall unzureichend ist. Dies entspricht aber den Erwartungen, da drei Spleißakzeptorstellen in enger Folge in einem natürlichen System nur sehr selten vorkommen dürften. Der Einfluß des “*scanning*” Mechanismus wird hier zu wenig in Betracht gezogen.

4.1.2 Die 3A-Site von *GTDs B* wird stringenter erkannt als die 3A-Site von *GTDs A*

Die Häufigkeit der Erkennung der 3A-Site Spleißstellen durch das Spleißeosom beeinflusst die Menge des gebildeten Wirtsgen:GUS Fusionstranskripts und damit die Expression des GUS Reporters. Eine nicht effektive Erkennung der 3A-Site kann zur Aktivierung alternativer Spleißstellen führen. Dies kann die Menge des Wirtsgen:GUS Fusionsproteins reduzieren. Für eine möglichst starke GUS-Expression sollte also die 3A-Site stringent erkannt werden. Da die Sequenz der Spleißstellen selber, sowie die Sequenz der in *cis*-wirksamen Elemente in den Intronsequenzen von *GTDs*, wie etwa der Polypyrimidintrakt (T-Stretch) und die Verzweigungsstelle, Einfluß auf die Spleißstellenselektion haben, sind Unterschiede in *GTDs A* und *GTDs B* zu erwarten. Die optimierten Strukturelemente in *GTDs B* sollen zu einer besseren Erkennung der synthetischen 3A-Site Spleißakzeptorstellen führen.

Hinweise auf die Stringenz der Erkennung lieferten die durchgeführten Versuche zur Spleißstellenbenutzung in *GTDs*. Sowohl bei *GTDs A* als auch bei *GTDs B* werden alle drei Spleißstellen der 3A-Site verwendet (3.2.1 und 3.2.2). Bei *GTDs A* zeigen sich jedoch im Unterschied zu *GTDs B* DNA Fragmente, die durch die Nutzung alternativer Spleißstellen entstehen können (3.2.1, Abbildung 9, Seite 33). Diese Spleißprodukte sind um 15 bis 60 bp größer als die bekannten Spleißprodukte. Diese alternativen Produkte können durch die Aktivierung kryptischer Donorstellen downstream von D4 oder kryptischer Akzeptorstellen upstream von A1 in Kombination mit den bekannten Spleißstellen entstehen. Die Aktivierung von kryptischen Donorstellen im Element downstream von D4 hat negative Auswirkungen auf die Expression des Reportergens. Es kommt dabei zu einem Abbruch der Translation, da die Sequenz dann in jedem Leserahmen mindestens ein Stop Codon enthält, dies vermindert die Stärke der GUS-Expression. Nussaume et al. (1995) haben in *Arabidopsis* und Tabak die Verwendung von alternativen Spleißstellen, D5 bis D8, beschrieben. Die Spleißstelle D5 liegt 69 bp downstream von D4, ihre Aktivierung kann einige der auftretenden Banden erklären. Die Nutzung einer kryptischen Spleißakzeptorstelle in *GTDs A* 23 bp upstream von A1 erklärt Banden der Größen 281,277,271 und 267 bp, wenn ein Spleißen in Kombination mit D1 bis D4 stattfindet. Eine zweite kryptische Akzeptorstelle, die sowohl in *GTDs A* als auch das *GTDs B* existiert, würde zu Produkten einer Größe von 309 bis 323 bp führen. Im dem als Testsystem verwendeten *gbss1* Gen befinden sich ebenfalls kryptische Spleißstellen, diese können in *GTDs A* durch eine schlechte Erkennung der 3A-Site Spleißstellen durch eine Interaktion zwischen den Exons aktiviert werden (Lorkovic et al. 2000). Drei putative Donorstellen liegen 55, 65 und 85 bp upstream des 5' *GTDs* Elementes und würden mit den kryptischen Akzeptorstellen zu Spleißprodukten der gefunden Größen führen. Auch kann es nach Parinov et al. (1999) bei schwachen Spleißstellen zu einer Beeinflussung des Spleißens von up- oder downstream gelegenen anderen Introns kommen, dies hat möglicherweise auch eine Auswirkung auf die Spleißstellenselektion in *gbss1* und könnte dadurch zu einigen der kryptischen Spleißstellennutzungen in *GTDs A* führen. Damit können die meisten der aufgetretenen unerwarteten Produkte durch die Nut-

zung alternativer Spleißstellen erklärt werden.

Zu einer weiteren negativen Beeinflussung der GUS-Expression kann es durch die Entstehung von Stop Codons im Leserahmen von GUS kommen. Ein TAG (+1-+3) und TGA (+7-+9) liegen im gleichen Leserahmen upstream vor der 4D-Site. Dadurch befindet sich ein Stop Codon in 1/3 der möglichen Exon Integrationen. Downstream von D2 liegt ein TAA (+20-+22), das resultierende Stop Codon deckt den zweiten der drei möglichen Leserahmen ab. In Kombination mit der Spleißakzeptorstelle A1 (*GTDs A*) und A2 (*GTDs B*) entsteht jedoch ein funktionales Produkt. Da die Bildung des entsprechenden Spleißproduktes D1A1 und D1A2 für *GTDs A* bzw. *B* nachgewiesen wurde, verhindert dieses Stop Codon eine GUS-Expression nicht vollständig. Für eine möglichst optimale Funktion im Hinblick auf das Spleißen und die GUS-Expression wäre die Entfernung der Stop-Codons, der kryptischen Spleißstellen und Anpassung der 4D-Site an die Konsensussequenzen für Donorstellen in monokotylen Pflanzen wünschenswert. Die 209bp umfassende Sequenz aus dem 3'Ac Ende, welches nun das 5' Ende der Elemente darstellt und für die *trans*-Aktivierung durch die Ac-TPase notwendig ist, kann jedoch nicht ohne Auswirkungen auf die Transposition verändert werden (zur Übersicht Kunze et al. (1997)).

Zur Untersuchung des Spleißens bei Integration in einem Intron wurde ein indirekter Nachweis der Spleißprodukte über den Nachweis von GUS-Expression gewählt (3.2.2). Dieser Ansatz ermöglicht eine Quantifizierung der Nutzung einzelner Spleißstellen und somit einen Vergleich der Spleißstellen innerhalb eines Elementes untereinander, der Elemente zueinander und im Vergleich zu pUbiGUS. Nur die über jeweils eine bestimmte Spleißakzeptorstelle erfolgten Spleißereignisse führen zu einem Signal durch GUS-Expression. Dadurch ist sowohl eine Zuordnung der Signale zu einer definierten Spleißstelle der 3A-Site als auch eine Quantifizierung möglich. Dies eröffnet die Möglichkeit, die 3A-Sites der beiden Elemente in der Häufigkeit der Nutzung zu vergleichen. Das Plasmid pUbiGUS wird zur Standardisierung des Tests verwendet, die Zahl der damit erhaltenen GUS-Expressionssignale wird als 100% gesetzt, und die Signale der Testerplamide werden darauf bezogen. In den Introns von *gbss1* finden sich in allen Leserahmen Stop-Codons, daher kann es nur zu einem aktiven GUS kommen, wenn diese durch Spleißen entfernt wurden.

Bei der Untersuchung zeigte sich, dass die GUS-Expression der *GTDs A* Intron Testerplamide und damit die Nutzung der Spleißstellen der 3A-Site in *GTDs A* im Vergleich zu *GTDs B* signifikant niedriger war (Abbildung 12, Seite 39). *GTDs B* A1 zeigt mit 53% relativer Aktivität die 27 fache Aktivität (Signalzahl) im Vergleich zu *GTDs A* A1 mit 1,9%.

GTDs B A2 und A3 zeigen ebenfalls eine deutliche Nutzung mit 4,7% und 4,3% relativer Aktivität. Dies ist elf mal schwächer als *GTDs B* A1. *GTDs B* zeigt in allen untersuchten Aspekten eine deutliche Verbesserung gegenüber *GTDs A*, die Expressionssignale sind häufiger, und bei allen Spleißstellen nachzuweisen (Abbildung 12). Selbst die in *GTDs B* am wenigsten benutzte Spleißstelle A3 zeigt immer noch eine doppelt so starke Nutzung wie die häufigste *GTDs A* Spleißstelle A1.

Um die gesamte Aktivierung beider 3A-Sites zu vergleichen, kann durch die Addition der relativen Aktivitäten der drei Spleißstellen die relative Aktivität der gesamten 3A-Site erhalten werden. Diese beträgt bei *GTDs A* 1,905% und bei *GTDs B* 62% relative Aktivität. Die 3A-Site von *GTDs A* zeigt damit 3,1% der Aktivität der 3A-Site von *GTDs B*. Die 3A-Site von *GTDs B* führt zu einer deutlich häufigeren GUS-Expression, daraus läßt sich auf eine größere Menge an GBSS1:GUS Fusionstranskript und damit auf eine stringenterere Erkennung im Vergleich zu der 3A-Site von *GTDs A* schließen.

Mehrere Vorgänge machen ein Erreichen einer relativen Aktivität der 3A-Site von 100% unwahrscheinlich. Beim Kontrollplasmid pUbiGUS, das als Referenz für 100% Aktivität verwendet wird, ist kein Spleißen von kodierenden Exons nötig. Zur Synthese von GUS nach der Transformation der Intronester müssen der untranslatierte Leader des Ubiquitin Promotors, sowie vier Introns des GBSS1 Gens durch Spleißen entfernt werden. Es gibt Hinweise, dass bei der Prozessierung von GBSS Transkripten alternative Spleißstellen benutzt werden, wie von Larkin und Park (1999) in Reis beschrieben. Außerdem berechnet "Splice predictor" (2.1.3.1) in der *gbss1* Sequenz drei mögliche alternative Spleißstellen. Deren Aktivierung führt in zwei Fällen zu einer Verkürzung des Transkriptes, diese hat allerdings keine Verschiebung des Leserahmens zur Folge und damit keinen Einfluß auf die GUS-Expression. Durch die Aktivierung der dritten Spleißstelle entsteht jedoch ein Stop Codon. Die relative Aktivität kann dennoch zum Vergleich der Spleißstellen der Elemente herangezogen werden, da mögliche Einflüsse der *gbss1* Sequenzumgebung auf das Spleißen beide Elemente gleichermaßen betreffen. Die Nutzung alternativer Spleißstellen, die zu einem Stop Codon führen, würde zwar die Häufigkeit der Signale beeinflussen, jedoch wäre der Effekt für *GTDs A* und *B* gleich. Nur wenn die Unterschiede im Spleißen in den *GTDs* Elementen begründet liegen, werden Veränderungen sichtbar.

Eine Verringerung der relativen Aktivität kann auch dadurch verursacht werden, dass *GTDs* durch Spleißen komplett aus dem Transkript entfernt wird. *GTDs* verfügt am 5' Ende über Spleißdonor- und am 3' Ende über Spleißakzeptorsequenzen des *Ac*-Transposons (Wessler 1989, 1991). Die Aktivierung dieser Spleißstellen ist nach Lal und Hannah (1999) von der Sequenzumgebung abhängig, zu der auch die Änderungen im Intronbereich des *GTDs* Elementes zählen. Eine weitere Möglichkeit für die geringere relative Aktivität von *GTDs* kann das von Parinov et al. (1999) für schwache Spleißstellen beschriebene "*exon skipping*" sein, dabei wird das Exon (hier die *GTDs* Sequenz) mit den beiden angrenzenden Introns (im *gbss1*) durch Spleißen entfernt.

Neben der wesentlich besseren Benutzung der Spleißstelle A1 in *GTDs B*, besteht ein weiterer wichtiger Unterschied darin, dass die Spleißakzeptorstelle A3 in *GTDs* im Gegensatz zu der von Sundaresan et al. (1995) eingesetzten 3A-Site benutzt wird. Bei der Untersuchung der Spleißstellen bei Integration in eine Exonsequenz (3.2.1) zeigen sich bei *GTDs A* zwei Spleißprodukte, die durch eine Nutzung von A3 entstanden sind (D3A3, D4A3) und ein Produkt bei *GTDs B*. Die bei *GTDs A* sichtbare zweite Kombination D4A3 kann in *GTDs B* von der sehr stark vertretenen Kombination D1A1 überdeckt werden (Abbildung 9, Seite 33). Eine

Aktivierung von A3 resultiert weniger wahrscheinlich durch den Einsatz in einer monokotylen Pflanze, da Chin et al. (1999) in Reis eine Aktivierung von A3 nicht nachweisen konnte, sondern daraus, dass die hier konstruierte 3A-Site (3.1.1) den bisher vorgestellten (Sundaresan et al. 1995; Bergmann 2000) in dieser Hinsicht überlegen ist. Bei der von Chin et al. (1999) verwendeten Methode läßt sich die Möglichkeit, dass ein A3 Spleißprodukt übersehen wurde, jedoch nicht komplett ausschließen.

Ohne eine Möglichkeit der Quantifizierung ist der Nachweis von Spleißprodukten wenig aussagekräftig, da eine sensitive PCR Methode auch Mengen an Transkript sichtbar machen kann, die nicht dazu führen eine für einen Nachweis nötige Proteinmenge zu bilden. Die hier angewendete quantitative Untersuchung der Spleißstellen wurde bisher für kein *Gene-Trap* Element eingesetzt. Der indirekte Nachweis der Aktivierung von A3 über die Quantifizierung der GUS-Expressionssignale zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen *GTDs A* und *GTDs B*, nur in *GTDs B* wurde eine deutliche Menge an GUS-Expressionssignalen erhalten.

Die deutlich nachweisbare Aktivierung alle drei Spleißstellen der 3A-Site von *GTDs B* in monokotylen Pflanzen zeigt, dass die entwickelte Optimierungsstrategie (3.1.1) erfolgreich war.

4.1.3 *GTDs B* führt zur effizienteren Identifizierung von “GUS Phänotypen” in Getreiden

Ziel des entwickelten *Gene-Trap* Elementes *GTDs B* ist eine effiziente Identifizierung von GUS-Expressions Phänotypen. Der experimentelle Vergleich mit dem in Hinblick auf die 3A-Site und die in *cis*-wirkenden Sequenzen in der Intronsequenz nicht optimierten *GTDs A* und, soweit möglich, mit einem für dikotyle Pflanzen verwendeten *Gene-Trap* nach Sundaresan et al. (1995), zeigt die Bereiche, in denen die Optimierung erfolgreich war.

Bei *GTDs B* konnte die Aktivierung kryptischer Spleißstellen vermindert werden (3.2.1). In allen Leserahmen sind mindestens zwei Produkte zu erwarten, die zur GUS-Expression führen (Abbildung 9, Seite 33). Insgesamt entspricht die Spleißdonorstellenbenutzung, bis auf D2A1 bei *GTDs A*, den von Nussaume et al. (1995) und Chin et al. (1999) angegebenen und in Tabelle 4 zusammengefassten Ergebnissen. Es wurden in Tabak sechs (Nussaume et al. 1995), in *Arabidopsis* sieben (Nussaume et al. 1995), in Reis fünf (Chin et al. 1999), in Gerste für *GTDs A* neun Spleißkombinationen und in *GTDs B* sieben verschiedene Spleißkombinationen gefunden. Das Spleißen von *GTDs* führt somit zu mehr unterschiedlichen Spleißprodukten als für das von Sundaresan et al. (1995) vorgestellte Element bei den Untersuchungen in *Arabidopsis*, Tabak und Reis festgestellt wurden. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, in allen Leserahmen ein Wirtsgen:GUS Fusionstranskript zu erhalten. Ebenso wurde von Nussaume et al. (1995) auch eine deutliche Nutzung der Spleißdonorstellen downstream von D4 festgestellt. Die daraus resultierenden Transkripte enthalten ein Stop-Codon im Leserahmen des GUS-Gens. Die von Chin et al. (1999) angewandte Untersuchungsmethode birgt die Gefahr, seltene Spleißprodukte nicht zu detektieren. Es wurde eine RT-PCR und noch eine weitere PCR durchgeführt, erst dann wurden die Produkte subkloniert und sequenziert, dabei wurden insgesamt nur 42

Tabelle 4: Vergleich der Spleißstellenaktivierung verschiedener *Gene-Trap* Elemente

Spleißkombination	<i>GTDs A</i>	<i>GTDs B</i>	<i>Arabidopsis</i> (Nussaume et al. 1995)	Tabak (Nussaume et al. 1995)	Reis (Chin et al. 1999)
D1A1	+	+	+	+	+
D1A2	+	+	+	+	+
D1A3	-	-	-	-	-
D2A1	+	-	-	-	-
D2A2	-	-	+	-	-
D2A3	-	-	-	-	-
D3A1	+	+	+	+	+
D3A2	+	+	+	+	+
D3A3	+	+	-	-	-
D4A1	+	+	+	+	-
D4A2	+	+	+	+	+
D4A3	+	?	-	-	-

Klone untersucht. Daher ist für Reis die Benutzung noch weiterer Spleißkombinationen nicht auszuschließen. Diese Annahme wird durch die von Nussaume et al. (1995) für Tabak und *Arabidopsis* erzielten Ergebnisse gestützt. Der Ansatz über eine Klonierung und die Auftrennung auf einem Gel zeigt, dass ein kloniertes Produkt nicht im Gel zu sehen ist (*Arabidopsis*: D2A2), und einige Produkte, die im Gel sichtbar sind, nicht kloniert wurden (*Arabidopsis*: D1A1, Tabak: D3A2, D4A1). Ebenso wurde bei den eigenen Experimenten ein Produkt kloniert, das nicht im Gel zu sehen ist (*GTDs A* D1A2) und es treten Produkte im Gel auf, die nicht kloniert werden konnten (z.B. D4A2, D4A3 für *GTDs A* und *B*) (Abbildung 9). Alle Untersuchungen bergen somit die Möglichkeit, seltene Spleißvarianten nicht identifizieren zu können.

Soweit die Daten aus der Literatur einen Vergleich von *GTDs A* und *GTDs B* mit dem von Sundaesan et al. (1995) vorgestellten *Gene-Trap* ermöglichen, wird bei *GTDs B* die Nutzung von Donorspleißstellen downstream von D4 stark reduziert. Im Vergleich zu *GTDs A* zeigt die häufige Aktivierung von A3 einen Vorteil von *GTDs B*.

Eine weitere theoretische Verbesserung von *GTDs B* stellt die Optimierung der Translationsinitiationsstelle in *GTDs B* dar, die dem Konsensus für pflanzliche Translationsinitiationsstellen entspricht (Joshi et al. 1997). Bei Transposition in das bei monokotylen Pflanzen häufig große Leader Intron wird das ATG des Reportergens zum Startpunkt der Translation. Da es nach Parinov et al. (1999) häufig zu Transposition in diesen Bereich kommt, soll durch diese Optimierung eine effektive Initiation der Translation erreicht werden.

Zusammenfassend betrachtet zeigen *GTDs A* und *B* folgende Eigenschaften in Hinblick auf die Identifizierung von GUS-Expressions Phänotypen. Die Aktivierung aller drei Akzeptorstellen der 3A-Site (3.2.1 und 3.2.2) sowie drei der vier Donorstellen in der 4D-Site (3.2.1) konnte in beiden Elementen gezeigt werden. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass unabhängig von der Transposition in Exon- oder Intronsequenzen *GTDs B* überall zu mindestens einem funktionalen Wirtsgen:GUS Fusionstranskript führt und damit den Nachweis einer GUS-Expression

wahrscheinlich macht. Die drei Spleißstellen der 3A-Site von *GTDs B* werden sehr effizient erkannt und benutzt. In *GTDs A* ist nur bei der Transposition in eine Exonsequenz und bei einer Transposition in eine Intronsequenz, bei der eine Aktivierung von A1 zu funktionalem GUS führt, mit einer Expression zu rechnen. Die Expression ist nach den hier gewonnenen Erkenntnissen sehr wahrscheinlich schwächer als bei *GTDs B*.

4.2 Transposition von GTDs

Für den Einsatz von *GTDs* in einem *Gene-Trap* System muß sich das Element von einer Transposase *trans*-aktivieren lassen. Um eine *trans*-Aktivierung zu ermöglichen, verfügen die *GTDs* Elemente über die notwendigen *cis* wirksamen Sequenzen, diese umfassen mindestens 238 bp der subterminalen Bereiche des 5' *Ac* Endes und 209 bp der subterminalen Bereiche des 3' *Ac* Endes sowie die Terminal Inverted Repeats (TIR) (zur Übersicht Kunze et al. (1997)). Diese werden von der der *Ac*-Transposase (*Ac*-TPase) erkannt.

Bei der Transposition eines Elementes können zwei Teilschritte nachgewiesen werden, die Exzision aus dem ursprünglichen Donorlokus und die Reintegration an einer neuen Position im Genom. Zusätzlich kann bei *GTDs* eine Transposition in ein exprimiertes Gen über den Nachweis von GUS-Expression detektiert werden.

Für *Ac*-Transposons aus Mais ist keine bevorzugte Integration in Introns oder Exons bekannt, die Transposition findet jedoch präferentiell in Gene (Chen et al. 1987; Enoki et al. 1999; Greco et al. 2001) und dort in den 5' Bereich statt (Parinov et al. 1999). Diese Präferenz macht den Einsatz des *Ac*-Transposons für *Tagging*- und *Gene-Trap* Ansätze in großen Genomen interessant, da ein größeres Genom bei Getreiden nicht auf einer höheren Anzahl von Genen, sondern auf einer Vergrößerung nicht kodierender Bereiche beruht (zur Übersicht Feuillet und Keller (2002)). Somit muss bei einer nicht für Gene präferentiellen Methode, wie die Transformation mit T-DNA, eine wesentlich höhere Zahl an Pflanzen hergestellt werden, um eine Kopie des *Gene-Trap* Elements in sämtliche Gene des Genoms zu integrieren. Größere Genome, wie zum Beispiel das von Gerste (5000Mb), bestehen aus vielen repetitiven Bereichen und weisen somit statistisch eine geringe Gendichte auf als kleinere Genome, etwa von *Arabidopsis* (125Mb) oder Reis (400Mb). Der Gene enthaltende Anteil des Genoms beträgt bei *Arabidopsis* 0,85, bei Reis 0,28 und bei Gerste 0,025 von der Gesamtgenomgröße (zur Übersicht Sandhu und Gill (2002)).

4.2.1 *GTDs* kann in Gerste von *Ac*-TPase *trans*-aktiviert werden

Die mit dem *cwAcΔ102* Konstrukt transformierten Linien (2.1.7) zeigen eine Expression der *Ac*-TPase in Gerste (Friedrich 2001) und die *Ac*-TPase kann Transposase abhängige Elemente in Gerste aktivieren (S. Lütticke, persönliche Mitteilung). Somit sind die *Ac*-TPase Linien ausreichend für einen Einsatz in einem *Gene-Trap* System charakterisiert, mit einer *trans*-Aktivierung von *GTDs* ist zu rechnen.

Zur Untersuchung der Transposition müssen zunächst Pflanzen identifiziert werden, die *GTDs* und *cwAcΔ102* enthalten. Das von Sundaresan et al. (1995) vorgestellte *Gene-Trap* System enthält zur schnellen Identifizierung von Pflanzen mit dem *Gene-Trap* Konstrukt das NPTII Gen, welches eine Resistenz gegen Kanamycin vermittelt. Durch Zugabe von Kanamycin in das Kulturmedium können so Pflanzen, welche das Element enthalten, selektiert werden. Diese Methode eignet sich jedoch nicht bei Einsatz der biolistischen Transformation, da es dort häufig zur Integration mehrerer Kopien kommt, die zum Teil nicht das komplette Konstrukt enthalten. Somit kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen.

Daher musste hier für eine einfache und schnelle Detektion von *GTDs* und *cwAcΔ102* positiven Pflanzenlinien ein anderer Weg gegangen werden. Die verwendete Multiplex PCR (2.2.10) ermöglicht den Nachweis von *GTDs* und dem *cwAcΔ102* Konstrukt. Die identifizierten Pflanzen konnten nach Hinweisen auf eine Transposition untersucht werden.

Eine Exzision von *GTDs* ist mit Hilfe einer PCR - Strategie nachweisbar. Dabei wurden "leere" Donorstellen ("Footprints") amplifiziert, die entstehen, wenn das Element seinen 5' und 3' von bekannten Vektorsequenzen flankierten Donorlokalus verlässt (3.3.2). Exzissionsereignisse können mit dem verwendeten Ansatz nur bei der ersten Exzision eines Elementes aus dem Transformationsvektor nachgewiesen werden, nach der Transposition wird *GTDs* von unbekannt Sequenzen flankiert. Bei der Exzision treten Basenveränderungen und Deletionen in unmittelbarer Umgebung des Exzissionsortes auf. Die Sequenzveränderungen werden vermutlich durch den Reparaturmechanismus nach der Exzision hervorgerufen (zur Übersicht Kunze et al. (1997)).

Die beiden identifizierten "Footprints" der *cw4xGTDs* A 5 Linie (3.3.2, Abbildung 15, Seite 44) zeigen eine Konversion von GC-GG zu GG-CG, es werden zwei Basen invertiert und eine Konversion einer Base von GC-GG zu GC-CG. Das Auftreten von zwei verschiedenen "Footprint" Sequenzen kann sich entweder durch die Exzision von zwei in der Pflanze enthaltenen *GTDs* Kopien erklären, oder aber die Exzision fand zweimal in unterschiedlichen Zellen statt. Die hier beschriebenen "Footprints" wurden von Scholz et al. (2001) nach Transposition autonomer Elemente ebenfalls in Gerste nachgewiesen. Die das Element flankierenden Bereiche beeinflussen wahrscheinlich den Reparaturmechanismus (Scott et al. 1996), der vermutlich für die Entstehung von Footprints verantwortlich ist. Das hier untersuchte *GTDs* A Element wird von identischen Vektorsequenzen flankiert wie das von Scholz et al. (2001) untersuchte autonome *Ac*-Element, daher entsprechen die Footprints den Erwartungen. In Reis wurden diese beiden "Footprints" von Izawa et al. (1991) und Greco et al. (2001) ebenfalls nachgewiesen, auch hier ist das *Ac* von Sequenzen aus dem *waxy-m7* Allel aus Mais flankiert. Dies stützt die These, dass die flankierenden Bereiche einen Einfluß auf die Bildung des "Footprints" haben.

Der Nachweis von Transpositionsereignissen über eine Southern-Blot Analyse erfolgte nach einer Vorselektion der Pflanzen über eine PCR Strategie (3.3.3). Diese Vorselektion erwies sich als sehr effektiv, die Zahl der zu untersuchenden Pflanzen wurde von 166 auf 28 reduziert, von denen in der Analyse drei neue Hybridisierungssignale zeigten (3.3.3, Abbildungen 16 bis

18). Da nur zwei der 28 Pflanzen in der ersten Untersuchung (3.3.3) neue *GTDs* spezifische Hybridisierungsmuster zeigten, lag der Verdacht nahe, dass es bei den anderen "Footprint" positiven Pflanzen zu einer Transposition nahe des Donorlokus gekommen ist. Transposition von *GTDs* in unmittelbarer Nähe der Donorposition ist aufgrund einer entsprechenden Präferenz des *Ac*-Transposons wahrscheinlich, dabei können viele Reintegrationen in nur 6 bp Entfernung des Donorlokus stattfinden (Dowe et al. 1990; Peterson 1990; Grotewold et al. 1991; Athma et al. 1992; Chen et al. 1992; Moreno et al. 1992; Weil et al. 1992), in *Arabidopsis* erfolgen 15% der Transpositionen in die Sequenz des T-DNA Transformationsvektors (Parinov et al. 1999). Eine Selektion gegen nahe Transpositionereignisse, wie in dem von Sundaresan et al. (1995) vorgestellten System über einen negativen Selektionsmarker, ist bei Einsatz biolistischer Transformation nicht möglich, da es häufig zur Integration mehrerer Kopien kommt. Damit ist es höchst wahrscheinlich, dass, selbst wenn es an einem Integrationsort zu einer ungekoppelten Transposition gekommen ist, die anderen Kopien des Markers noch im Genom vorhanden und aktiv sind. Erfolgt die Transposition in die unmittelbare Nähe des Donorlokus, so erfordert der Nachweis eines solchen Ereignisses eine Anpassung der Southern-Blot Analyse. Bei Verwendung eines Enzyms, dessen Erkennungssequenz nahe am *GTDs* Element im Transformationsvektor liegt, kann man auch bei Transpositionen in diese Bereiche ein verändertes Hybridisierungssignal erkennen. Bei der Analyse der Pflanze 20C6 (Abbildung 16, Seite 47) zeigt nur ein solches Enzym, *ClaI*, ein neues Element-spezifisches Hybridisierungssignal. Dies stützt die Vermutung auf eine Transposition in die nächste Umgebung des Donorlokus. Bei zwei anderen Pflanzen, 20C2 und 22B3, gibt es Hinweise auf eine Erhöhung der Zahl der Elemente, da zusätzlich zu den Hybridisierungssignalen der Elternpflanze neue Signale hinzukommen, während die ursprünglichen Signale erhalten bleiben. Zu einer Erhöhung der Elementzahl kann es kommen, wenn die Transposition während der Replikation in noch nicht replizierte Bereiche stattfindet (Greenblatt 1984; Chen et al. 1987). Für das *Ac*-Transposon gibt es Hinweise, dass die Transposition von *Ac* mit der Replikation gekoppelt ist (zur Übersicht Kunze et al. (1997)). Für *Ac* wurde eine Erhöhung der Elementzahl bereits von Yoder (1990) in Tomate und von Scholz (2000) in Gerste beschrieben. Dabei konnte Yoder (1990) in einer Linie eine Erhöhung von einem auf acht Elemente, Scholz (2000) in eine Linie eine Zunahme von einem auf vier Elemente nachweisen.

Die in allen Pflanzen gefundenen Hybridisierungsmuster können somit durch eine Transposition und Erhöhung der Kopienzahl von *GTDs* erklärt werden. Neben Transpositionen könnte auch ein chromosomales Rearangement, etwa durch Rekombination, neue Hybridisierungsmuster verursachen. Die per PCR nachgewiesenen "Footprints" (3.3.3) in den entsprechenden Linien sind aber ein guter Hinweis auf eine Transposition und sprechen so gegen eine Rekombination. Da die Pflanzen das *Ac*-TPase Gen nicht mehr enthalten, kann der "Footprint" nur in der F1 Generation entstanden sein, somatische Transposition ist somit ebenfalls auszuschließen.

Die für die Transposition in der F1 ermittelte Frequenz von 2,4% (3.3.3) ist nicht repräsentativ. Von den 126 Pflanzen die eine Transposition von *GTDs* zeigen können, wurden nur 28 per

Southern-Blot Analyse untersucht (3.3.3). Da es sich um keine zufällige Stichprobe handelt, können die Werte nicht für eine statistische Untersuchung der Transpositionsfrequenz herangezogen werden. Von diesen 28 Pflanzen wurde wiederum nur eine auf eine nahe Transposition geprüft. Aufgrund der über die "Footprint" PCR (3.3.3) erhaltenen Hinweise ist vermutlich noch bei mehreren der anderen Pflanzen eine Transposition nahe dem Donorlokus erfolgt. Die Frequenz von 2,4% ist daher nur als Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen zu interpretieren, sie liegt etwas höher als die von Scholz et al. (2001) in Gerste mit 1,5% und von Koprek et al. (2000) mit 2% festgestellte. Auch in *Arabidopsis* wurde von Altmann et al. (1992) ein Wert von 2% ermittelt.

Damit gibt es erste Hinweise auf eine *trans*-Aktivierung von *GTDs* durch die Ac-TPase.

4.2.2 Die Expression des *GTDs* Reportergens in Keimlingen gibt Hinweise auf eine Transposition

Die Ergebnisse der Southern-Blot Analysen (3.3.3) geben Hinweise auf eine Transposition von *GTDs* an eine neue genomische Position. Zusammen mit dem Nachweis der Exzision (3.3.2) und der Expression des Reportergens in F3 Keimlingen (3.3.4) gibt es bei *GTDs A* damit deutliche Hinweise, dass eine Transposition in Gerstenpflanzen stattfindet. Damit haben drei unabhängige Untersuchungsmethoden Hinweise auf eine Transposition von *GTDs* in Gerste geliefert. Dies entspricht den Erwartungen, da von Scholz et al. (2001) eine Transposition von *Ac* und Koprek et al. (2000) eine Transposition von *Ds* in Gerste bereits gezeigt wurde, und das hier verwendete *GTDs* Element über alle bekannten *cis*-aktiven Sequenzen des *Ac*-Transposons verfügt. Damit sollte auch *GTDs B* *trans*-aktiviert werden können, da die *cis*-aktiven Sequenzen in beiden Elementen identisch sind.

Es fällt allerdings auf, dass GUS-exprimierende Keimlinge in den einzelnen Linien mit sehr unterschiedlicher Frequenz auftreten (3.3.4, Tabelle 19). Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch schon von Koprek et al. (2000) für die Transposition von *Ds* Elementen in Gerste beschrieben. Dort kam es in unterschiedlichen F2 Linien zu einer Transpositionsrate zwischen 0% und 47%. Mögliche Ursache kann neben zufälligen Schwankungen eine unterschiedliche Aktivität der Transposase Komponente sein. Da die beiden Transposase exprimierenden Linien *cw2* und *cw4* (2.1.7) sowohl in GUS-exprimierenden Nachkommenlinien mit höherer als auch mit niedrigerer GUS-Expression vorkommen, lassen sich Unterschiede in der Transposase Aktivität als Ursache ausschließen. Eine weitere mögliche Ursache stellen die *GTDs* Kopienzahl sowie der Integrationsort dieser Kopien dar. Da aber nichts über Integrationsort und -orientierung der *GTDs* Kopien bekannt ist und die untersuchten Linien auf der gleichen Primärintegration beruhen, läßt sich dazu ohne die Untersuchung weiterer unabhängiger Linien keine gesicherte Aussage treffen. Allerdings kann auf Basis bekannter Mechanismen eine mögliche Erklärung formuliert werden. Die Linien mit den wenigsten (2) und meisten (6) *GTDs* Kopien zeigen die geringste Aktivität. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine der *GTDs* Kopien gesprungen ist, ist bei wenigen Kopien kleiner als bei einer höheren Anzahl an Kopien. Sind zwei der *GTDs* Kopien in

entgegengesetzter Orientierung in räumlicher Nähe zueinander integriert, kann es zu chromosomalen Rearrangements kommen (English et al. 1993), die einer Transposition entgegenwirken. Dies ist in einer Linie mit mehr Kopien wahrscheinlicher.

Bei den untersuchten Keimlingen zeigt sich die GUS-Expression in unterschiedlichen Geweben und mit unterschiedlicher Stärke. Dies spricht für eine Transposition von *GTDs A* in unterschiedliche Gene. Die Pflanze 15A1 (Abbildung 19, Seite 52) zeigt eine GUS-Expression in allen untersuchten Geweben, dies spricht für die Integration in ein konstitutiv exprimiertes Gen. Die anderen Expressionsmuster können von einer somatischen Transposition in spezifisch oder konstitutive exprimierte Gene verursacht werden. Im Fall von 20C6 (Abbildung 19), wo die Transposition vermutlich schon in einer früheren Generation erfolgt ist, könnte es sich um eine Integration in ein spezifisch in Leitgeweben und Skutellum exprimiertes Gen handeln. Für eine Transposition spricht auch, dass in den nicht mit einer Transposase exprimierenden Linie gekreuzten *GTDs* Kontrollpflanzen keine GUS-Expression festgestellt werden konnte.

Ein Vergleich der GUS-Expressionsfrequenz mit den von Sundaresan et al. (1995) in *Arabidopsis* (26%) und Chin et al. (1999) in Reis (8%) ermittelten Frequenzen ist nur eingeschränkt möglich, da in diesen Untersuchungen eine Selektion auf entfernte Transpositionen durchgeführt wurde, und damit nur Pflanzen untersucht wurden, die ein Transpositionsereignis des *Gene-Trap* Elementes zeigten. In der hier durchgeführten Untersuchung fand keine Selektion der untersuchten Pflanzen auf ein Transpositionsereignis statt, die festgestellte Expressionsfrequenz lag bei 1,2%. Berücksichtigt man, dass statistisch 25% der untersuchten Pflanzen aufgrund von Segregation das *GTDs* Element verloren haben, erhöht sich die Expressionsfrequenz auf 1,6%. Damit erscheint es wahrscheinlich, dass in einer Untersuchung, in der ausschließlich Pflanzen mit Transpositionsereignissen eingesetzt werden, wie bei Sundaresan et al. (1995) und Chin et al. (1999), die GUS-Expressionsfrequenz von *GTDs A* über den hier ermittelten 1,6% liegt.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse deutliche Hinweise auf eine Expression des GUS Reportergens von *GTDs A* nach einer Transposition. Inwieweit es zur Identifizierung von interessanten Genen eingesetzt werden kann, müssen weitere Untersuchungen klären. Bei der Verwendung von *GTDs B* ist nach den Ergebnissen der Untersuchungen mit einer wesentlich höheren Expressionsfrequenz und stärkeren GUS Signalen zu rechnen, da die 3A-Site Spleißstellen dort signifikant häufiger aktiviert werden. Damit wird eine effizientere Identifizierung interessanter Gene möglich.

4.3 Ausblick

Ein Schritt zur schnelleren Erzeugung von Linien mit transponierten *GTDs*-Elementen stellt die Kotransformation des Ac-TPase Konstruktes *cwAc Δ 102* und *GTDs B* dar, wodurch die Kreuzung einzelner Linien überflüssig werden würde. Problematisch ist dabei nur die bevorzugte Integration mehrerer Kopien an einem Integrationslokus bei der gut etablierten biolistischen Transformation (Wan und Lemaux 1994; Scholz et al. 2001). Dadurch kann die Stabilisierung

von *GTDs* durch Entfernen der Ac-TPase mittels Segregation in Nachkommen erschwert werden. Eine Transformation mit Agrobakterien würde dieses Problem deutlich reduzieren, besonders wenn mit zwei verschiedenen Stämmen transformiert wird. Dabei sind die Integrationsloki meist nicht eng gekoppelt, und es werden weniger Kopien in das Genom integriert als bei der biologischen Transformation. Mehrere *GTDs* Integrationen können gerade in großen Genomen aber auch vorteilhaft sein, besonders bei Pflanzen wie Gerste, bei denen große Populationen viel Platz beanspruchen (Martienssen 1998). Mit mehreren *GTDs* Kopien pro Linie reduziert sich die Zahl der Pflanzen, die erzeugt werden müssen, damit ein *GTDs* Element in sämtlichen Genen des Genoms vorhanden ist.

Die Wahl eines geeigneten Reportergens (Übersicht in Springer (2000)) entscheidet über die Sensitivität und Durchführbarkeit des *Gene-Trap* Ansatzes. Neben Sensitivität, d.h. geringer Schwellenwert für Nachweis und gute Unterscheidung von eventuellen pflanzlichen Hintergrundsignalen, ist auch die Möglichkeit der Untersuchung größerer Populationen mit möglichst geringem Aufwand und Kosten für ein vielseitig einsetzbares Element von Bedeutung. Im *GTDs* Element findet das GUS-Gen Verwendung, welches eine sensitive Detektion seines Genproduktes erlaubt und lange N-terminale Fusionen, wie sie in einem *Gene-Trap* System zu erwarten sind, die Enzymfunktion nicht stören (Jefferson 1987). Dies bestätigte sich auch in den Untersuchungen des Spleißens der 3A-Site mit den Intronester Plasmiden (3.2.2). Die Funktion von GUS wird durch die statistisch zu erwartende Länge des Wirtsgen-Proteins bei der Wirtsgen:GUS Fusion nicht stark beeinträchtigt, da eine Integration in den 5' Bereich eines Gens wahrscheinlich ist und dort die meisten Insertionen innerhalb von 500 bp ab dem Translationsstart ATG liegen (Parinov et al. 1999). Bei den Intronester Plasmiden befindet sich die GUS Integration 660 bp (nur Exonsequenzen) downstream des Translationsstarts, dies entspricht einer 220 Aminosäuren umfassenden C-terminalen Fusion. GUS wurde bereits vielfach mit guten Ergebnissen in Pflanzen eingesetzt. Das GUS Enzym ist mit Hilfe von verschiedenen Substraten und Nachweismethoden zu detektieren. Nachteile von GUS sind jedoch der letale Nachweis-Assay und die hohen Kosten für das Substrat. Als alternative Reportergene bieten sich *gfp* oder *Luziferase* an. Ein GFP Protein, welches in *Arabidopsis* die Sensitivität von GUS erreicht, beschreiben Haseloff und Amos (1995). Keines der hier vorgestellten Reportergene erfüllt allerdings alle genannten Anforderungen, so dass für unterschiedliche Zielsetzungen, wie etwa die einfache und kostengünstige Untersuchung aller Gewebe der Pflanze in großen Populationen, oder aber eine sehr sensitive Untersuchung einzelner Gewebe einer Pflanze, *Gene-Trap* Elemente mit darauf optimierten Reportergenen eingesetzt werden müssen. Im ersten Fall würde sich ein GFP basiertes *Gene-Trap* anbieten, für den zweiten Fall wäre ein GUS basiertes besser geeignet.

Eine Verbesserung von Effizienz und Sensitivität könnte durch eine weitere Veränderung des *Gene-Trap* Systems zu erreichen sein. In *Gene-Trap* Systemen in Maus wird häufig statt einer mehrfachen Spleißakzeptorstelle eine einfache Akzeptorstelle gefolgt von einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) verwendet (Mountford und Smith 1995; Chowdhury et al. 1997). Bei einer effektiven Nutzung dieser Eintrittsstelle könnte dieser Ansatz die Zahl der Integratio-

nen, die zur Expression des Reportergens führen, im Vergleich zu alternativem Spleißen über mehrere Spleißstellen verdoppeln, da die Translation des Reportergens dann unabhängig von der Element-Orientierung und dem Leserahmen wäre. Auch bei Integrationen, bei denen das Reportergen des *Gene-Trap* Elementes in entgegengesetzter Orientierung zum Wirtsgen liegt, findet eine Initiation der Translation an der IRES statt. In Pflanzen sind bereits mehrere interne Ribosomeneintrittsstellen viralen Ursprungs beschrieben worden (Urwin et al. 2000; Toth et al. 2001; Koh et al. 2003). Ihre Nutzung ist jedoch noch wenig untersucht, und der virale Ursprung könnte sich besonders in Hinblick auf Freilandversuche, die bei grösseren Ansätzen aus Platzgründen wohl notwendig wären, als nachteilig erweisen.

Die vorgestellten Ergebnisse liefern deutliche Hinweise auf eine Transposition von *GTDs*. Einen weiteren Beweis würde auch der Nachweis von den neuen *GTDs* flankierenden Sequenzen liefern. Mit Hilfe von verschiedenen Methoden, AIMS (Frey et al. 1998) iPCR (Ochman et al. 1988) oder Tail-PCR (Liu et al. 1995), kann die flankierende genomische Sequenz des *GTDs* Elementes ermittelt werden. Besonders bei mehreren *GTDs* Kopien im Genom kann es dabei schwierig sein, spezifisch die flankierende Sequenz der transponierten Kopie zu amplifizieren und die Amplifikation der flankierenden Sequenzen von nicht transponierten Kopien zu unterdrücken. Für den Fall, dass das *GTDs* in ein Gen transponiert ist, bietet sich eine Möglichkeit, spezifisch nur die Exonsequenz des Wirtsgens upstream von der GUS Sequenz zu erhalten. Dafür wird das Wirtsgen:GUS Fusionstranskript in einer 5' RACE PCR Strategie (Frohman et al. 1988) eingesetzt. Mit beiden Ansätzen lassen sich dann über Datenbank-Vergleiche Transpositionen in bereits bekannte Gene identifizieren.

Das hier entwickelte und auf die Verwendung in monokotylen Pflanzen optimierte *Gene-Trap* Element *GTDs B* eignet sich nach den erzielten Erkenntnissen für einen effektiven Einsatz in einem *Gene-Trap* System zur Untersuchung von Genfunktion und Expression in Getreiden. Besonders die Optimierung der Intronsequenz von *GTDs B* hat zu einer deutlich verbesserten Aktivierung der 3A-Site geführt. Dies läßt einen guten Nachweis der Expression von "getrappeten" Genen erwarten. Besonders auch im Hinblick auf einen Einsatz in Weizen, der mit seinem hexaploiden Genom konventionellen Funktionsanalysen über Mutationen nur schwer zugänglich ist, stellt *GTDs B* eine interessante Entwicklung dar.

5 Zusammenfassung

Die Untersuchung von Mutanten mit einem erkennbaren Phänotyp ist ein klassischer Ansatz zur Isolierung von Genen und zur Bestimmung der Funktion von Genprodukten. Eine systematische Analyse von knock-out Mutanten in Hefe hat allerdings zu der Erkenntnis geführt, dass ein signifikanter Teil von Mutationen in keinem sichtbaren Phänotyp resultiert (Ross-Macdonald 2000). Die Identifizierung von funktional redundanten Genen und Genen, deren Produkte in mehreren Entwicklungsstadien gebraucht werden, ist besonders schwierig. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Technologien entwickelt, welche die Identifizierung solcher Gene erlauben. Die verbindende Komponente all dieser Systeme ist die Integration von Reporter-gen-Konstrukten in das zu untersuchende Genom. Die Expression des Reporter-gens hängt hierbei von der Transkription des chromosomalen Gens ab, in welches das Reporter-gen-Konstrukt integriert ist.

Die Identifizierung eines Gens erfolgt somit auf der Basis seines Expressionsmusters. Spezielle Konstruktionsmerkmale der Reporter-gen-Konstrukte sollen für die Expression des Reporter-enzym sorgen. Upstream eines promotorlosen Reporter-gens befindet sich eine dreifache Spleißakzeptorsequenz (3A-Site), die so konstruiert ist, dass eine translationale Fusion des Reporters in jedem der drei möglichen Leserahmen mit dem Produkt des Gens erfolgen kann, in das das Konstrukt integriert ist. Weitere wichtige *cis*-Elemente upstream des Reporter-gens sind Intronsequenzen, die die Verzweigungsstelle und die optimale DNA-Sequenzumgebung für ein effektives Spleißen liefern. Eine Spleißdonorsequenz upstream dieser Sequenzen, ermöglicht die Bildung des Wirtsgenprodukt::Reporter Fusion bei Integration des Konstruktes in ein Exon des Gens.

Zur effizienten Umsetzung dieser Technologie wurden modifizierte Transposons, so genannte *Gene-Trap* Elemente, entwickelt. Zur Insertionsmutagenese mit diesen Elementen werden meistens zwei Komponenten Systeme eingesetzt, die aus dem Transposase-abhängigen *Gene-Trap* Element und einem Transposase-exprimierenden Element bestehen. Liegen beide Elemente in einer Zelle vor, transponiert das *Gene-Trap* Element in neue Positionen im Genom. Das *Gene-Trap* Element wird in der genomischen Position stabilisiert, indem die Transposase aus dem genetischen Hintergrund entfernt wird.

Die Effizienz eines *Gene-Trap* Systems hängt wesentlich von der erfolgreichen Bildung des Reporters ab. Hier ist entscheidend, dass eine translationale Fusion zwischen dem Produkt des Transposon-markierten Gens und dem Reporter gebildet wird. Der grundlegende Prozess hierfür ist eine effiziente Nutzung jeder der drei Spleißstellen in der 3A-Site. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein *Gene-Trap* Element zu entwickeln, dessen Strukturelemente derart optimiert sind, dass sie ein effizientes Spleißen über alle drei Spleißakzeptorstellen in monokotylen Pflanzen erlauben. Das *Gene-Trap* Element ist ein Transposase-abhängiges Element auf der Basis des *Ac*-Transposons aus Mais und enthält somit die *cis*-aktiven Sequenzen, die zur Transposition benötigt werden. In diesen *Ac*-Sequenzen befinden sich upstream des verwendeten GUS Reporters vier putative Spleißdonorstellen.

In einem vorher entwickelten *Gene-Trap* Element *GTDs A* (*Gene-Trap Ds*) (Bergmann 2000), wurden die notwendigen *cis*-Strukturelemente durch eine Intronsequenz eines monokotylen Gens mit einer künstlichen 3A-Site upstream eines Reportergens bereitgestellt. Erste Untersuchungen zur Funktion dieses Elementes zeigten ein erhebliches Potential für eine weitere Verbesserung der Nutzung der 3A-Site. Dafür wurden in dem hier entwickelten *Gene-Trap* Element *GTDs B* mehrere am Spleißprozeß beteiligte strukturelle Elemente modifiziert. Dazu gehörte die Bereitstellung einer Sequenz-optimierten Verzweigungsstelle im richtigen Abstand upstream der 3A-Site, sowie eine Optimierung des T-Stretches zwischen Verzweigungsstelle und 3A-Site. Der Abstand der drei Spleißstellen der 3A-Site zueinander wurde im Vergleich zu *GTDs A* verringert und die Sequenz der ersten Spleißakzeptorstelle modifiziert.

Zur Untersuchung der Spleißvorgänge wurden *GTDs A* und *GTDs B* in Testerplasmide kloniert, welche die Integration von *GTDs* in Intron- oder Exonsequenzen eines Gens simulieren sollen. Eine Untersuchung der Nutzung jeder einzelnen Spleißakzeptorstelle der 3A-Site über einen Nachweis von GUS-Expression zeigte eine 32 mal bessere Erkennung der 3A-Site in *GTDs B*. In *GTDs B* werden die Spleißakzeptorstellen A2 und A3 im Gegensatz zu *GTDs A* effizient genutzt. Die Präferenz der Nutzung lag allerdings bei beiden Elementen bei der Akzeptorstelle A1.

Die Untersuchung der Nutzung der Spleißdonorstellen in den *Ac*-Sequenzen in Kombination mit der 3A-Site, zeigte für beide Elemente eine Nutzung der Donorspleißstellen D1, D3 und D4 in Kombination mit jeder der Akzeptorspleißstellen. Eine Präferenz lag bei der Nutzung der Kombinationen D1A1 und D3A1. Damit werden in *GTDs A* und *GTDs B* Spleißprodukte unter Nutzung sämtlicher Spleißakzeptorstellen der 3A-Site gebildet. Jeder Leserahmen wird durch mindestens zwei Spleißvarianten repräsentiert, die beiden präferentiell gebildeten Produkte decken zwei der drei Leserahmen ab. Zusammenfassend konnte somit festgestellt werden, dass die *cis*-aktiven Sequenzen, die ein effizientes Spleißen vom Reporter an das endogene Gen ermöglichen, in *GTDs B* stringenter erkannt und somit effizienter genutzt werden als in *GTDs A*.

Drei verschiedene Untersuchungen ergaben deutliche Hinweise auf eine Transposition des *GTDs A* Elementes in Gerste. Es konnten so genannte "Footprints" nachgewiesen werden, die bei einer Exzision von *GTDs* aus dem zur Transformation verwendeten Konstrukt entstehen. Des weiteren konnten F2-Pflanzen identifiziert werden, die in einer Southern-Blot Analyse neue Element-spezifische Hybridisierungsmuster zeigen, die durch eine Transposition von *GTDs A* erklärt werden können. Außerdem deutet der Nachweis von GUS Aktivität in F3-Keimlingen einer ersten *Gene-Trap* Population auf eine Transposition von *GTDs A* in transkribierte Gensequenzen hin. Hier konnten von insgesamt 1592 untersuchten Individuen 19 Keimlinge mit GUS Expression in verschiedenen Geweben identifiziert werden. Damit wurde nicht nur gezeigt, dass *GTDs A* in Gerste transponiert, sondern auch, dass es in einem *Gene-Trap* System zur Identifizierung von Genexpressionsmustern eingesetzt werden kann.

6 Literatur

Literatur

ALTMANN, T. ; SCHMIDT, R. ; WILLMITZER, L.: Establishment of a gene tagging system in *Arabidopsis thaliana* based on the maize transposable element Ac. In: *Theor. Appl. Genet.* 84 (1992), S. 371–83

ATHMA, P. ; GROTEWOLD, E. ; PETERSON, T.: Insertional mutagenesis of the maize P gene by intragenic transposition of Ac. In: *Genetics* 131 (1992), Nr. 1, S. 199–209

BARAN, G. ; ECHT, C. ; BUREAU, T. ; WESSLER, S.: Molecular analysis of the maize wx-B3 allele indicates that precise excision of the transposable Ac element is rare. In: *Genetics* 130 (1992), Nr. 2, S. 377–84

BAULCOMBE, D. C.: RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. In: *Plant Mol Biol* 32 (1996), Nr. 1, S. 79–88

BAYNTON, C. E. ; POTTHOFF, S. J. ; MCCULLOUGH, A. J. ; SCHULER, M. A.: U-rich tracts enhance 3' splice site recognition in plant nuclei. In: *Plant J* 10 (1996), Nr. 4, S. 703–11

BECHTOLD, N. ; ELLIS, J. ; PELLETIER, G.: In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. In: *CR Acad. Sci. (Paris)* 316 (1993), S. 1194–1199

BECKER, D. ; BRETTSCHEIDER, R. ; LORZ, H.: Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. In: *Plant J* 5 (1994), Nr. 2, S. 299–307

BELLEN, H. J.: Ten years of enhancer detection: lessons from the fly. In: *Plant Cell* 11 (1999), Nr. 12, S. 2271–81

BELLEN, H.J. ; O'KANE, C.J. ; WILSON, C. ; GROSSNIKLAUS, U. ; PEARSON, R.K. ; GEHRING, W.J.: P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. In: *Genes Dev* 3 (1989), Nr. 9, S. 1288–1300

BERGMANN, C.: Modifizierung des Ac-Transposons aus Mais zu einem Gene-Trap Element und Überprüfung des Funktionskonzeptes. In: *Diplomarbeit Universität Hamburg, Fachbereich Biologie* (2000)

BEWLEY, J D.: Seed Germination and Dormancy. In: *The Plant Cell* 9 (1997), Nr. 7, S. 1055–1066

BIER, E. ; VAESSIN, H. ; SHEPHERD, S. ; LEE, K. ; MCCALL, K. ; BARBEL, S. ; ACKERMAN, L. ; CARRETTO, R. ; UEMURA, T. ; GRELL, E.: Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. In: *Genes Dev* 3 (1989), Nr. 9, S. 1273–1287

BRENDEL, V. ; KLEFFE, J.: Prediction of locally optimal splice sites in plant pre-mRNA with applications to gene identification in *Arabidopsis thaliana* genomic DNA. In: *Nucleic Acids Res* 26 (1998), Nr. 20, S. 4748–57

BROWN, J. W. ; SIMPSON, C. G. ; THOW, G. ; CLARK, G. P. ; JENNINGS, S. N. ; MEDINA-ESCOBAR, N. ; HAUPT, S. ; CHAPMAN, S. C. ; OPARKA, K. J.: Splicing signals and factors in plant intron removal. In: *Biochem Soc Trans* 30 (2002), Nr. 2, S. 146–9

BURNS, N. ; GRIMWADE, B. ; ROSS-MACDONALD, P.B. ; CHOI, E.-Y. ; FINBERG, K. ; ROEDER, G.S. ; SNYDER, M.: Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genes Dev* 8 (1994), S. 1087–1105

CASADABAN, M. J. ; COHEN, S. N.: Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using Mu-lac bacteriophage: In vivo probe for transcriptional control sequences. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979), S. 4530–33

CASSON, S. A. ; CHILLEY, P. M. ; TOPPING, J. F. ; EVANS, I. M. ; SOUTER, M. A. ; LINDSEY, K.: The POLARIS gene of *Arabidopsis* encodes a predicted peptide required for correct root growth and leaf vascular patterning. In: *Plant Cell* 14 (2002), Nr. 8, S. 1705–21

CECCONI, F. ; MEYER, B. I.: Gene trap: a way to identify novel genes and unravel their biological function. In: *FEBS Lett* 480 (2000), Nr. 1, S. 63–71.

CHEN, J. ; GREENBLATT, I. M. ; DELLAPORTA, S. L.: Transposition of Ac from the P locus of maize into unreplicated chromosomal sites. In: *Genetics* 117 (1987), Nr. 1, S. 109–16

CHEN, J. ; GREENBLATT, I. M. ; DELLAPORTA, S. L.: Molecular analysis of Ac transposition and DNA replication. In: *Genetics* 130 (1992), Nr. 3, S. 665–76

CHIN, H. G. ; CHOE, M. S. ; LEE, S. H. ; PARK, S. H. ; KOO, J. C. ; KIM, N. Y. ; LEE, J. J. ; OH, B. G. ; YI, G. H. ; KIM, S. C. ; CHOI, H. C. ; CHO, M. J. ; HAN, C. D.: Molecular analysis of rice plants harboring an Ac/Ds transposable element-mediated gene trapping system. In: *Plant J* 19 (1999), Nr. 5, S. 615–23

CHOWDHURY, K. ; BONALDO, P. ; TORRES, M. ; STOYKOVA, A. ; GRUSS, P.: Evidence for the stochastic integration of gene trap vectors into the mouse germline. In: *Nucleic Acids Res* 25 (1997), Nr. 8, S. 1531–6

CHRISTENSEN, A.H. ; SHARROCK, R. A. ; QUAIL, P. H.: Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. In: *Plant Mol Biol* 18 (1992), Nr. 4, S. 675–89

COUPLAND, G. ; PLUM, C. ; CHATTERJEE, S. ; POST, A. ; STARLINGER, P.: Sequences near the termini are required for transposition of the maize transposon Ac in transgenic tobacco plants. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989), Nr. 23, S. 9385–8

DOWE, M. F. ; ROMAN, G. W. ; KLEIN, A. S.: Excision and transposition of two Ds transposons from the bronze mutable 4 derivative 6856 allele of *Zea mays* L. In: *Mol Gen Genet* 221 (1990), Nr. 3, S. 475–85

DUNWELL, J. M.: Transgenic approaches to crop improvement. In: *J Exp Bot* 51 (2000), S. 487–96

ENGLISH, J. J. ; HARRISON, K. ; JONES, J. D.: A genetic analysis of DNA sequence requirements for Dissociation state I activity in tobacco. In: *Plant Cell* 5 (1993), Nr. 5, S. 501–14

ENOKI, H. ; IZAWA, T. ; KAWAHARA, M. ; KOMATSU, M. ; KOH, S. ; KYOZUKA, J. ; SHIMAMOTO, K.: Ac as a tool for the functional genomics of rice. In: *Plant J* 19 (1999), Nr. 5, S. 605–13

FEDOROFF, Nina: Maize transposable elements. In: BERG, E.; Howe M. M. (Hrsg.): *Mobile Elements*. Washington DC : American Society for Microbiology, 1989, S. 374–411

FEUILLET, C. ; KELLER, B.: Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. In: *Ann Bot (Lond)* 89 (2002), Nr. 1, S. 3–10

FREY, Monica ; STETTNER, Cornelia ; GIERL, Alfons: A general method for gene isolation in tagging approaches: amplification of insertion mutagenised sites (AIMS). In: *The Plant Journal* 13 (1998), Nr. 5, S. 717–721

FRIEDRICH, C.: Detaillierte molekulare Analyse der Komponenten cwAcD102 und mDs eines Zwei-Komponenten-Tagging-Systems in transgener Gerste (*Hordeum vulgare* L.). In: *Diplomarbeit Universität Hamburg* (2001)

FRIEDRICH, G. ; SORIANO, P.: Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. In: *Genes Dev* 5 (1991), Nr. 9, S. 1513–23

FROHMAN, M. A. ; DUSH, M. K. ; MARTIN, G. R.: Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988), Nr. 23, S. 8998–9002

GIERL, A. ; SAEDLER, H.: Plant-transposable elements and gene tagging. In: *Plant Mol Biol* 19 (1992), Nr. 1, S. 39–49

GOEBL, M. G. ; PETES, T. D.: Most of the yeast genomic sequences are not essential for cell growth and division. In: *Cell* 46 (1986), Nr. 7, S. 983–92

GOFF, S. A. ; RICKE, D. ; LAN, T. H. ; PRESTING, G. ; WANG, R. ; DUNN, M. ; GLAZEBROOK, J. ; SESSIONS, A. ; OELLER, P. ; VARMA, H. ; HADLEY, D. ; HUTCHISON, D. ; MARTIN, C. ; KATAGIRI, F. ; LANGE, B. M. ; MOUGHAMER, T. ; XIA, Y. ; BUDWORTH, P. ;

ZHONG, J. ; MIGUEL, T. ; PASZKOWSKI, U. ; ZHANG, S. ; COLBERT, M. ; SUN, W. ; CHEN, L. ; COOPER, B. ; PARK, S. ; WOOD, T. C. ; MAO, L. ; QUAIL, P. ; WING, R. ; DEAN, R. ; YU, Y. ; ZHARKIKH, A. ; SHEN, R. ; SAHASRABUDHE, S. ; THOMAS, A. ; CANNINGS, R. ; GUTIN, A. ; PRUSS, D. ; REID, J. ; TAVTIGIAN, S. ; MITCHELL, J. ; ELDREDGE, G. ; SCHOLL, T. ; MILLER, R. M. ; BHATNAGAR, S. ; ADEY, N. ; RUBANO, T. ; TUSNEEM, N. ; ROBINSON, R. ; FELDHAUS, J. ; MACALMA, T. ; OLIPHANT, A. ; BRIGGS, S.: A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). In: *Science* 296 (2002), Nr. 5565, S. 92–100

GOSSLER, A. ; JOYNER, A. L. ; ROSSANT, J. ; SKARNES, W. C.: Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. In: *Science* 244 (1989), Nr. 4903, S. 463–5

GRANT, S.G.N.: In: *Proc. Natl. Acad. Sci* 87 (1990), S. 4645–4649

GRECO, R. ; OUWERKERK, P. B. ; TAAL, A. J. ; FAVALLI, C. ; BEGUIRISTAIN, T. ; PUIGDOMENECH, P. ; COLOMBO, L. ; HOGE, J. H. ; PEREIRA, A.: Early and multiple Ac transpositions in rice suitable for efficient insertional mutagenesis. In: *Plant Mol Biol* 46 (2001), Nr. 2, S. 215–27.

GREENBLATT, I. M.: A chromosomal replication pattern deduced from pericarp phenotypes resulting from movements of the transposable element, Modulator, in maize. In: *Genetics* 108 (1984), S. 471–85

GROTEWOLD, E. ; ATHMA, P. ; PETERSON, T.: A possible hot spot for Ac insertion in the maize P gene. In: *Mol Gen Genet* 230 (1991), Nr. 1-2, S. 329–31

HALL, Q. ; MAURA, C.: The cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein RSH is essential for normal embryo development in Arabidopsis. In: *Plant Cell* 14 (2002), Nr. 5, S. 1161–72

HANAHAN, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *J. Mol. Biol.* 166 (1983), Nr. 4, S. 557–580

HASELOFF, J. ; AMOS, B.: GFP in plants. In: *Trends Genet* 11 (1995), Nr. 8, S. 328–29

HE, Y. ; GAN, S.: A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in Arabidopsis. In: *Plant Cell* 14 (2002), Nr. 4, S. 805–15

HE, Y. ; TANG, W. ; SWAIN, J. D. ; GREEN, A. L. ; JACK, T. P. ; GAN, S.: Networking senescence-regulating pathways by using Arabidopsis enhancer trap lines. In: *Plant Physiol* 126 (2001), Nr. 2, S. 707–16

HEALY, J. ; CORR, C. ; DEYOUNG, J. ; BAKER, B.: Linked and unlinked transposition of a genetically marked Dissociation element in transgenic tomato. In: *Genetics* 134 (1993), Nr. 2, S. 571–84

HENSGENS, L. A. ; BAKKER, E. P. de ; OS-RUYGROK, E. P. van ; RUEB, S. ; MARK, F. van de ; MAAS, H. M. van der ; VEEN, S. van der ; KOOMAN-GERSMANN, M. ; HART, L. ; SCHILPEROORT, R. A.: Transient and stable expression of gusA fusions with rice genes in rice, barley and perennial ryegrass. In: *Plant Mol Biol* 23 (1993), Nr. 4, S. 643–69

HIWATASHI, Y. ; NISHIYAMA, T. ; FUJITA, T. ; HASEBE, M.: Establishment of gene-trap and enhancer-trap systems in the moss *Physcomitrella patens*. In: *Plant J* 28 (2001), Nr. 1, S. 105–16.

HOLDING, D. R. ; SPRINGER, P. S.: The vascular prepatter enhancer trap marks early vascular development in arabidopsis. In: *Genesis* 33 (2002), Nr. 4, S. 155–9

HORTON, R. M. ; HUNT, H. D. ; HO, S. N. ; PULLEN, J. K. ; PEASE, L. R.: Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. In: *Gene* 77 (1989), Nr. 1, S. 61–8

HOUBA-HERIN, N. ; BECKER, D. ; POST, A. ; LARONDELLE, Y. ; STARLINGER, P.: Excision of a Ds-like maize transposable element (*Ac delta*) in a transient assay in *Petunia* is enhanced by a truncated coding region of the transposable element *Ac*. In: *Mol Gen Genet* 224 (1990), Nr. 1, S. 17–23

HUMMEL, H. S. ; GILLESPIE, R. D. ; SWINDLE, J.: Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 45, S. 35522–31

IZAWA, T. ; MIYAZAKI, C. ; YAMAMOTO, M. ; TERADA, R. ; IIDA, S. ; SHIMAMOTO, K.: Introduction and transposition of the maize transposable element *Ac* in rice (*Oryza sativa* L.). In: *Mol Gen Genet* 227 (1991), Nr. 3, S. 391–6

JEFFERSON, Richard A.: Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system. In: *Plant Mol. Biol. Reporter* 5 (1987), Nr. 4, S. 387–405

JEON, J. S. ; LEE, S. ; JUNG, K. H. ; JUN, S. H. ; JEONG, D. H. ; LEE, J. ; KIM, C. ; JANG, S. ; YANG, K. ; NAM, J. ; AN, K. ; HAN, M. J. ; SUNG, R. J. ; CHOI, H. S. ; YU, J. H. ; CHOI, J. H. ; CHO, S. Y. ; CHA, S. S. ; KIM, S. I. ; AN, G.: T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. In: *Plant J* 22 (2000), Nr. 6, S. 561–70

JOSHI, C. P. ; ZHOU, H. ; HUANG, X. ; CHIANG, V. L.: Context sequences of translation initiation codon in plants. In: *Plant Mol Biol* 35 (1997), Nr. 6, S. 993–1001.

KLUTH, A. ; SPRUNCK, S. ; BECKER, D. ; LORZ, H. ; LUTTICKE, S.: 5' deletion of a gbss1 promoter region from wheat leads to changes in tissue and developmental specificities. In: *Plant Mol Biol* 49 (2002), Nr. 6, S. 669–82

KOH, D.C. ; WONG, S. M. ; LIU, D.X.: Synergism of the 3' UTR and an internal ribosome entry site differentially enhances the translation of a plant virus coat protein. In: *J Biol Chem* (2003)

KOPREK, T. ; MCELROY, D. ; LOUWERSE, J. ; WILLIAMS-CARRIER, R. ; LEMAUX, P. G.: Technical advance: An efficient method for dispersing Ds elements in the barley genome as a tool for determining gene function. In: *Plant J* 24 (2000), Nr. 2, S. 253–63

KOPREK, T. ; MCELROY, D. ; LOUWERSE, J. ; WILLIAMS-CARRIER, R. ; RANGEL, S. ; LEMAUX, P. G.: Transposon-mediated single-copy gene delivery leads to increased transgene expression stability in barley. In: *Plant Physiol* 125 (2001), Nr. 3, S. 1354–62

KUMAR, M. ; CARMICHAEL, G. G.: Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (1998), Nr. 4, S. 1415–34

KUNZE, R. ; KÜHN, S. ; JONES, J. D. G. ; SCOFIELD, S. R.: Somatic and germinal activities of maize Activator (Ac) transposase mutants in transgenic tobacco. In: *The Plant Journal* 8 (1995), S. 45–54

KUNZE, R. ; SAEDLER, H. ; LÖNNING, W. E.: Plant Transposable Elements. In: CALLOW, J. A. (Hrsg.): *Advances in Botanical Research incorporating Advances in Plant Pathology*. San Diego : Academic Press, 1997 (27), S. 332–470

LAL, S. K. ; HANNAH, L. C.: Maize transposable element Ds is differentially spliced from primary transcripts in endosperm and suspension cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 261 (1999), Nr. 3, S. 798–801

LARKIN, P. D. ; PARK, W. D.: Transcript accumulation and utilization of alternate and non-consensus splice sites in rice granule-bound starch synthase are temperature-sensitive and controlled by a single-nucleotide polymorphism. In: *Plant Mol Biol* 40 (1999), Nr. 4, S. 719–27

LECHNER, E. ; GOLOUBINOFF, P. ; GENSHIK, P. ; HUI, W.H.: A gene trap Dissociation insertion line, associated with a RING-H2 finger gene, shows tissue specific and developmental regulated expression of the gene in Arabidopsis. In: *Gene* 290 (2002), Nr. 1-2, S. 63–71

LIU, Y. G. ; MITSUKAWA, N. ; OOSUMI, T. ; WHITTIER, R. F.: Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. In: *Plant J* 8 (1995), Nr. 3, S. 457–63

LORKOVIC, Z. J. ; WIECZOREK-KIRK, D. A. ; LAMBERMON, M. H. ; FILIPOWICZ, W.: Pre-mRNA splicing in higher plants. In: *Trends Plant Sci* 5 (2000), Nr. 4, S. 160–7.

LUDWIG, S. R. ; HABERA, L. F. ; DELLAPORTA, S. L. ; WESSLER, S.: Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), S. 7092–96

MAES, T. ; KEUKELEIRE, P. D. ; GERATS, T.: Plant tagnology. In: *Trends Plant Sci* 4 (1999), Nr. 3, S. 90–96

- MARTIENSSSEN, R. A.: Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Nr. 5, S. 2021–6
- MATZKE, M. A. ; MATZKE, A. J. ; PRUSS, G. J. ; VANCE, V. B.: RNA-based silencing strategies in plants. In: *Curr Opin Genet Dev* 11 (1998), Nr. 2, S. 221–7
- MCELROY, D. ; BLOWERS, A. D. ; JENES, B. ; WU, R.: Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. In: *Mol Gen Genet* 231 (1991), Nr. 1, S. 150–60
- MCELROY, D. ; LOUWERSE, J. ; MCELROY, S. M. ; LEMAUX, P. G.: Development of a simple transient assay for Ac/Ds activity in cells of intact barley tissue. In: *The Plant Journal* 11 (1997), Nr. 1, S. 157–165
- MCELROY, D. ; ZHANG, W. ; CAO, J. ; WU, R.: Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. In: *Plant Cell* 2 (1990), S. 163–171
- MÜLLER-NEUMANN, M. ; YODER, J.I. ; STARLINGER, P.: The DNA sequence of the transposable element Ac of *Zea mays* L. In: *Molecular and General Genetics* 198 (1984), S. 19–24
- MORENO, M. A. ; CHEN, J. ; GREENBLATT, I. ; DELLAPORTA, S. L.: Reconstitutive mutagenesis of the maize P gene by short-range Ac transpositions. In: *Genetics* 131 (1992), Nr. 4, S. 939–56
- MORGANTE, M. ; SALAMINI, F.: From plant genomics to breeding practice. In: *Curr Opin Biotechnol* 14 (2003), Nr. 2, S. 214–9
- MOUNTFORD, P. S. ; SMITH, A. G.: Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. In: *Trends Genet* 11 (1995), Nr. 5, S. 179–84
- MURASHIGE, T. ; SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: *Physiol. Plant* 15 (1962), S. 473–497
- NUSSAUME, L. ; HARRISON, K. ; KLIMYUK, V. ; MARTIENSSSEN, R. ; SUNDARESAN, V. ; JONES, J. D.: Analysis of splice donor and acceptor site function in a transposable gene trap derived from the maize element Activator. In: *Mol Gen Genet* 249 (1995), Nr. 1, S. 91–101
- OCHMAN, H. ; GERBER, A. S. ; HARTL, D. L.: Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. In: *Genetics* 120 (1988), Nr. 3, S. 621–3
- O'KANE, C.J. ; GEHRING, W.J.: Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1987), Nr. 24, S. 9123–9127
- OLIVER, S. G. ; AART, Q. J. van der ; AGOSTONI-CARBONE, M. L. ; AIGLE, M. ; ALBERGHINA, L. ; ALEXANDRAKI, D. ; ANTOINE, G. ; ANWAR, R. ; BALLESTA, J. P. ; BENIT,

- P. ; ET a. l.: The complete DNA sequence of yeast chromosome III [see comments]. In: *Nature* 357 (1992), Nr. 6373, S. 38–46
- PARINOV, S. ; SEVUGAN, M. ; DE, Y. e. ; YANG, W. C. ; KUMARAN, M. ; SUNDARESAN, V.: Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines. A database for reverse genetics in arabidopsis [In Process Citation]. In: *Plant Cell* 11 (1999), Nr. 12, S. 2263–70
- PAZ-ARES, J. ; GHOSAL, D. ; WIENAND, U. ; PETERSON, P. A. ; SAEDLER, H.: The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. In: *EMBO J.* 6 (1987), S. 3553–58
- PAZ-ARES, J. ; WIENAND, U. ; PETERSON, P. A. ; SAEDLER, H.: Molecular cloning of the c locus of *Zea mays*: a locus regulating the anthocyanin pathway. In: *EMBO J.* 5 (1986), S. 829–33
- PETERSON, T.: Intragenic transposition of Ac generates a new allele of the maize P gene. In: *Genetics* 126 (1990), Nr. 2, S. 469–76
- POHLMAN, R. F. ; FEDOROFF, N. V. ; MESSING, J.: Correction: nucleotide sequence of Ac [letter]. In: *Cell* 39 (1984), Nr. 2 Pt 1, S. 417
- ROSS-MACDONALD, P.: Functional analysis of the yeast genome. In: *Funct Integr Genomics* 1 (2000), Nr. 2, S. 99–113
- SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E.T. ; MANIATIS, T.: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- SANDHU, D. ; GILL, K. S.: Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes. In: *Plant Physiol* 128 (2002), Nr. 3, S. 803–11
- SANFORD, J. C.: The biolistic process. In: *Trends in Biotechnology* 6 (1988), S. 299–302
- SANGER, F. ; NICKLEN, S. ; COULSON, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977), Nr. 12, S. 5463–7
- SCHOLZ, S.: Das Ac-Element aus *Zea mays* L. in Gerste (*Hordeum vulgare* L.): Nachweis der Transposition und Ansätze zur Transposon-Mutagenese. In: *Dissertation Universität Hamburg, Fachbereich Biologie* (2000)
- SCHOLZ, S. ; LORZ, H. ; LUTTICKE, S.: Transposition of the maize transposable element Ac in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Mol Gen Genet* 264 (2001), Nr. 5, S. 653–61
- SCOTT, L. ; LAFOE, D. ; WEIL, C. F.: Adjacent sequences influence DNA repair accompanying transposon excision in maize. In: *Genetics* 142 (1996), Nr. 1, S. 237–46

SHEIKH, S. N. ; LAZARUS, P.: Re-usable DNA template for the polymerase chain reaction. In: *Nucleic Acids Res* 25 (1997), Nr. 17, S. 3537–42

SHORT, J.M. ; FERNANDEZ, J.M. ; SORGE, J.A. ; HUSE, W.D.: Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. In: *Nucleic Acids Res* 16 (1988), Nr. 15, S. 7583–7600

SIMPSON, C. G. ; CLARK, G. ; DAVIDSON, D. ; SMITH, P. ; BROWN, J. W. S.: Mutation of putative branchpoint consensus sequences in plant introns reduces splicing efficiency. In: *Plant J* 9 (1996), Nr. 3, S. 369–80

SIMPSON, C. G. ; HEDLEY, P. E. ; WATTERS, J. A. ; CLARK, G. P. ; MCQUADE, C. ; MACHRAY, G. C. ; BROWN, J. W.: Requirements for mini-exon inclusion in potato invertase mRNAs provides evidence for exon-scanning interactions in plants. In: *RNA* 6 (2000), Nr. 3, S. 422–33

SIMPSON, C. G. ; THOW, G. ; CLARK, G. P. ; JENNINGS, S. N. ; WATTERS, J. A. ; BROWN, J. W.: Mutational analysis of a plant branchpoint and polypyrimidine tract required for constitutive splicing of a mini-exon. In: *RNA* 8 (2002), Nr. 1, S. 47–56

SIMPSON, G. G. ; FILIPOWICZ, W.: Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. In: *Plant Mol Biol* 32 (1996), Nr. 1-2, S. 1–41

SKARNES, W. C. ; AUERBACH, B. A. ; JOYNER, A. L.: A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lacZ reported is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. In: *Genes Dev* 6 (1992), Nr. 6, S. 903–18

SOUTHERN, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. In: *J. Mol. Biol.* 98 (1975), S. 503–517

SPRINGER, P. S.: Gene traps. Tools for plant development and genomics. In: *Plant Cell* 12 (2000), Nr. 7, S. 1007–20

SPRINGER, P. S. ; MCCOMBIE, W. R. ; SUNDARESAN, V. ; MARTIENSSEN, R. A.: Gene trap tagging of PROLIFERA, an essential MCM2-3-5-like gene in Arabidopsis. In: *Science* 268 (1995), Nr. 5212, S. 877–80

STEINER-LANGE, S. ; GREMSE, M. ; KUCKENBERG, M. ; NISSING, E. ; SCHAECHTELE, D. ; SPENRATH, N. ; WOLFF, M. ; SAEDLER, H. ; DEKKER, K.: Efficient identification of Arabidopsis knock-out mutants using DNA-arrays of transposon flanking sequences. In: *Plant Biology* 3 (2001), S. 391–97

SUNDARESAN, V. ; SPRINGER, P. ; VOLPE, T. ; HAWARD, S. ; JONES, J. D. ; DEAN, C. ; MA, H. ; MARTIENSSEN, R.: Patterns of gene action in plant development revealed

by enhancer trap and gene trap transposable elements. In: *Genes Dev* 9 (1995), Nr. 14, S. 1797–810

SUTTON, W. D. ; GERLACH, W. L. ; SCHWARTZ, D. ; PEACOCK, W. J.: Molecular analysis of Ds controlling element mutations at the Adh1 locus of maize. In: *Science* 223 (1984), S. 1265–1268

TANAKA, S. ; NAKAMURA, S. ; MOCHIZUKI, N. ; NAGATANI, A.: Phytochrome in cotyledons regulates the expression of genes in the hypocotyl through auxin-dependent and -independent pathways. In: *Plant Cell Physiol* 43 (2002), Nr. 10, S. 1171–81

TOTH, R. L. ; CHAPMAN, S. ; CARR, F. ; CRUZ, S. S.: A novel strategy for the expression of foreign genes from plant virus vectors. In: *FEBS Lett* 489 (2001), Nr. 2-3, S. 215–9

URWIN, P. ; YI, L. ; MARTIN, H. ; ATKINSON, H. ; GILMARTIN, P. M.: Functional characterization of the EMCV IRES in plants. In: *Plant J* 24 (2000), Nr. 5, S. 583–9

WAN, Yuechun ; LEMAUX, Peggy G.: Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. In: *Plant Physiology* 104 (1994), S. 37–48

WANG, M. B. ; WATERHOUSE, P. M.: Application of gene silencing in plants. In: *Curr Opin Plant Biol* 5 (2002), Nr. 2, S. 146–50

WATERHOUSE, P. M. ; WANG, M. B. ; FINNEGAN, E. J.: Role of short RNAs in gene silencing. In: *Trends Plant Sci* 6 (2001), Nr. 7, S. 297–301

WEIJERS, D. ; FRANKE-VANDIJK, M. ; VENCKEN, R. J. ; QUINT, A. ; HOOYKAAS, P. ; OFFRINGA, R.: An Arabidopsis Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene. In: *Development* 128 (2001), Nr. 21, S. 4289–99

WEIL, C. F. ; MARILLONNET, S. ; BURR, B. ; WESSLER, S. R.: Changes in state of the Wx-m5 allele of maize are due to intragenic transposition of Ds. In: *Genetics* 130 (1992), Nr. 1, S. 175–85

WESSLER, S. R.: The splicing of maize transposable elements from pre-mRNA—a minireview. In: *Gene* 82 (1989), Nr. 1, S. 127–33

WESSLER, S. R.: The maize transposable Ds1 element is alternatively spliced from exon sequences. In: *Mol Cell Biol* 11 (1991), Nr. 12, S. 6192–6

WILSON, C. ; PEARSON, R.K. ; BELLEN, H.J. ; O’KANE, C.J. ; GROSSNIKLAUS, U. ; GEHRING, W.J.: P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in Drosophila. In: *Genes Dev* 3 (1989), Nr. 9, S. 1301–1313

YODER, J. I.: Rapid proliferation of the maize transposable element Activator in transgenic tomato. In: *Plant Cell* 2 (1990), Nr. 8, S. 723–30

YOSHIOKA, Y. ; KUREI, S. ; MACHIDA, Y.: Identification of a monofunctional aspartate kinase gene of *Arabidopsis thaliana* with spatially and temporally regulated expression. In: *Genes Genet Syst* 76 (2001), Nr. 3, S. 189–98

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg in der Abteilung Angewandte Molekularbiologie der Pflanzen (AMP II) angefertigt.

Mein Dank gilt alle denen, die mich während dieser Zeit unterstützt und für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben.

Ganz besonderen Dank, möchte ich aber folgenden Personen aussprechen:

Prof. Dr. H. Lörz für die Bereitstellung des Themas sowie des Arbeitsplatzes. Ebenso für die Betreuung und das an meiner Arbeit gezeigte Interesse.

Prof. Dr. U. Wienand für die Bereitschaft diese Arbeit als Gutachter zu bewerten.

Dr. Stephanie Lütticke für ihre exzellente Betreuung meiner Arbeit und unsere kritisch – konstruktiven Gespräche, die viele Ideen geboren und meinen Fokus auf dem wesentlichen gehalten haben. Und natürlich nicht zuletzt für das intensive Korrekturlesen dieser Arbeit.

Sabina Miaskowska, Angela Kahl und Margot Binnewies, für ihren unermüdlichen Einsatz besonders bei Gewebekultur, Transformation, Kreuzung und Pflege der untersuchten Pflanzen.

Katina Lazarow, Celia Friedrich, Maram Girgi, Angela Kahl, Margot Binnewies, Sabina Miaskowska, Dr. Inka Pusch, Dr. Stephanie Lütticke, Dr. Manfred Garz, Dr. Stefan Scholten und Dr. Petra Herrmann für die fröhlich - produktive Arbeitsatmosphäre und den einen oder anderen Gefallen, der das Laborleben erleichtert.

Meinem Vater, dem Jäger des verlorenen Kommas, der mich gelehrt hat, dass nicht alle „das“ gleich sind.

Und natürlich nicht zuletzt meiner Frau Gabi, die mich besonders in der Endphase dieser Arbeit sehr unterstützt und zur wesentlichen Verbesserung meiner Stimmung beigetragen hat.

Lebenslauf

Name	Christian Philip Bergmann
geboren am	15.03.1973
Geburtsort	Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulische Ausbildung

1979 - 1983	Grundschule Niendorf Markt, Hamburg
1983 - 1992	Gymnasium Bondenwald, Hamburg
Juni 1992	Abitur
Juli 1992 - Juni 1993	Wehrdienst 3. Panzergrenadierbataillon 182, Bad Segeberg

Universitäre Ausbildung

April 1994 – Oktober 1994	Studium Lehramt Grund und Mittelstufe (Biologie/Geographie), Universität Hamburg.
Oktober 1994 – Juli 2000	Studium Biologie (Diplom), Universität Hamburg. Hauptfach Molekularbiologie/Genetik, Nebenfächer Mikrobiologie und Informatik.
Juli 2000	Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg, AMP II, Abteilung Prof. Dr. H. Lörz. Thema: „Modifizierung des <i>Ac</i> -Transposons aus Mais zu einem „ <i>Gene-Trap</i> “ Element und Überprüfung des Funktionskonzeptes“.
September 2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg, AMP II, Abteilung Prof. Dr. H. Lörz.