

**Ein *gene trap*-System in Gerste (*Hordeum vulgare* L.):
Etablierung und Charakterisierung von *gene trap*-Linien**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Katina Lazarow
aus Varna

Hamburg 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. LÖRZ
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. U. WIENAND
Tag der Disputation: 24. Februar 2006

Hamburg, den 05. Februar 2006



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Lieberei', written in a cursive style.

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Verbrauchsmaterial	11
2.1.3	Enzyme und Kits	11
2.1.4	Größenstandards	11
2.1.5	Vektoren	12
2.1.6	Oligonukleotide	12
2.1.7	Sonden	13
2.1.8	Pflanzenmaterial	14
2.1.8.1	Transposase-Linien	14
2.1.8.2	GTDsB-Linien	15
2.1.9	Bakterien	15
2.1.10	Analysesoftware und Datenbanken	15
2.1.11	Sequenzierung	15
2.2	Methoden	16
2.2.1	<i>Embryo Rescue</i>	16
2.2.2	Kreuzung von Gerste	16
2.2.3	Isolierung genomischer DNA aus Gerste	16
2.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gerste	16
2.2.5	Restriktion von DNA	17
2.2.6	Multiplex-PCR zur Genotypisierung von GT-Linien	17
2.2.7	RT-PCR	17
2.2.7.1	RT-PCR verschiedener Gewebe	17
2.2.7.2	RT-PCR zum Nachweis zusammengesetzter Transkripte	18
2.2.8	5'RACE	18
2.2.9	Kolonie-PCR	20
2.2.10	Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden	20
2.2.11	Herstellung eines Digoxigenin-markierten <i>gus-antisense</i> -Transkripts	20
2.2.12	Southernblotanalyse von genomischer DNA	20
2.2.13	Southernblotanalyse von PCR-Produkten	21
2.2.14	Northernblotanalyse	21
2.2.15	Subklonierung von PCR-Fragmenten	22
2.2.16	Histochemischer GUS-Assay	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Etablierung der <i>gene trap</i> -Population	23
3.1.1	Auswahl und Charakterisierung von GTDsB-Linien	23
3.1.2	Kreuzung von Transposase- und GTDsB-Linien	27

INHALT

3.1.3	F1- und F2-Generation der <i>gene trap</i> -Population	27
3.2	Transposition von GTDsB	29
3.2.1	Transposition von GTDsB in der GT-F1-Population	30
3.2.2	Transposition von GTDsB in der GT-F2-Population	32
3.3	Phänotypische Abweichungen in der GT-F2-Population	35
3.4	Untersuchungen zur Expression des <i>gus</i> -Reportergens	36
3.4.1	Auswahl der Explantate für die histochemischen Analysen der GT-F2-Population	36
3.4.2	Etablierung des GUS-Färbeprotokolls	39
3.4.3	Durchmusterung der GT-F2-Explantate auf Expression von GUS	41
3.4.3.1	Frequenz der GUS-Expression in den einzelnen Organen	44
3.4.3.2	Identifizierung von GT-Linien mit Hinweisen auf vererbare Ereignisse	45
3.5	Analysen zur GUS-Expression der Linien GT35 und GTDsB 26	46
3.5.1	Untersuchungen zur Transposition von GTDsB in der Linie GT35	47
3.5.2	Untersuchungen zur entwicklungspezifischen GUS-Expression	48
3.5.3	Nachweis von <i>gus</i> -Transkripten	49
3.5.4	Nachweis von <i>gus</i> -Fusionstranskripten	51
3.5.5	Analyse der 5'terminalen Fusionen von <i>gus</i> -Fusionstranskripten	52
3.5.5.1	Amplifizierung von 5'Enden von <i>gus</i> -Fusionstranskripten durch 5'RACE mit poly(dG)- <i>tailing</i>	52
3.5.5.2	Sequenzanalyse der amplifizierten 5'Enden	53
3.5.5.3	Amplifizierung der 5'Enden von <i>gus</i> -Fusionstranskripten durch 5'RACE mit poly(dA)- <i>tailing</i>	55
3.5.5.4	Sequenzanalyse der durch 5'RACE mit poly(dA)- <i>tailing</i> amplifizierten 5'Enden	57
3.5.5.5	Amplifizierung und Analyse stromaufwärts im 5'Ende liegender Sequenzen	59
3.5.5.6	Analyse des 5'Endes der Sequenz 2.2	60
3.5.6	Nachweis von <i>in silico</i> zusammengesetzten Sequenzen	62
3.5.7	Nachweis der <i>gus</i> -Fusionstranskripte in verschiedenen Geweben	64
4	Diskussion	66
4.1	Frequenz und Zeitpunkt der Transposition von GTDsB	67
4.2	Einfluss der Transposase auf die Transposition von GTDsB	71
4.3	Expression des <i>gus</i> -Reportergens und Vergleich zu anderen <i>gene trap</i> -Systemen	73
4.4	Molekularer Nachweis eines <i>gus</i> -Fusionstranskripts	78
4.5	Ansätze zur Anwendung der <i>gene trap</i> -Linien	80
5	Zusammenfassung	82
6	Literatur	85

Abkürzungen und Einheiten

1 Einleitung

Eine effektive Strategie für die Verbindung von Gensequenzen mit der Funktion des Genproduktes ist die Insertionsmutagenese. Bei dieser Form der Mutagenese integriert eine bekannte Sequenz in ein Gen und verändert dadurch die Genstruktur. Die Folge kann eine Veränderung der Genfunktion sein, die bestenfalls zu einem veränderten Phänotyp führt. Eine systematische Analyse von *knock out*-Mutanten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hat demonstriert, dass ein signifikanter Teil der Mutationen nicht zu sichtbaren phänotypischen Veränderungen führt (Ross-Macdonald 2000). Es wird geschätzt, dass in Hefe 60-70% der Gene nach einer Transposoninsertion keinen mutanten Phänotyp zeigen (Goebel und Petes 1986, Oliver *et al.* 1992, Burns *et al.* 1994). Die Möglichkeiten der funktionellen Genomanalyse wurden durch die Entwicklung von modifizierten Insertionselementen, den sogenannten *gene traps*, erweitert. *Gene trap*-Konstrukte verfügen über ein Reportergen, dessen Expression von der Transkription des chromosomalen Gens abhängt, in welches das Konstrukt integriert ist. Folglich kann bei der Integration eines *gene traps* in ein Gen ein Marker für dessen Expression generiert werden, so dass ein sichtbarer veränderter Phänotyp, der die Funktion des korrespondierenden Gens reflektiert, für die Zuordnung von Genfunktion und Gensequenz nicht mehr notwendig ist. *Gene trap*-Konstrukte erlauben somit die Identifizierung von Genen, die funktional redundant sind, eine Funktion in mehreren Entwicklungsstadien haben oder deren Mutation letal ist und wurden daher sehr erfolgreich in der Entwicklungsbiologie von *Drosophila* und Maus eingesetzt (Bellen 1999, zur Übersicht).

Es wurden verschiedene Typen von *gene trap*-Systemen entwickelt (Springer 2000): *enhancer trap*, *promotor trap* und *gene trap*. Diese unterscheiden sich in dem verwendeten Reportergen-Konstrukt und werden alle unter dem Begriff *gene trap* zusammengefasst. Die *enhancer trap*-Konstrukte werden zur Identifizierung von Enhancern eingesetzt (O’Kane und Gehring 1987, Bellen *et al.* 1989, Bier *et al.* 1989, Wilson *et al.* 1994). Im *enhancer trap* wird die Expression des Reporters durch einen Minimalpromotor initiiert. Die Einwirkung eines Enhancers verstärkt die Aktivität des Minimalpromotors, was zum indirekten Nachweis der Expression des Zielgens über den Reporter führen kann. *Promotor trap*-Konstrukte (Friedrich und Soriano 1991) enthalten ein promotorloses Reportergen, welches bei Insertion im richtigen Leserahmen in ein Exon exprimiert werden kann. Im Gegensatz zum *promotor trap* kann das *gene trap* nach Insertion in ein Exon oder Intron exprimiert werden. Wenn das *gene trap* in ein Intron inseriert, können die transkribierten Reportergen-Sequenzen über die Element-eigenen Spleißakzeptorstellen mit dem davor liegenden Exon verspleißt werden (Abb. 1 A). Für den Fall der Insertion in ein Exon (Abb. 1 B) enthält das *gene trap*-Konstrukt im 5’Ende Spleißdonorstellen, so dass über die Spleißakzeptorstellen ein Verspleißen des Reporter-Transkripts mit dem endogenen Transkript möglich wird. Drei, jeweils um eine Base gegeneinander verschobene Spleißakzeptorstellen ermöglichen eine transkriptionale Fusion zwischen dem Reportergen und dem endogenen Gen in jedem der drei Leserahmen. In der Zelle entsteht so eine Population von Fusionstranskripten, bei der die Reportersequenz theoretisch über jede der drei Spleißakzeptorstellen prozessiert werden kann. Nur die Nutzung einer der drei möglichen Spleißakzeptorstellen führt zu einem Transkript, von dem ein

funktionales Reporterprotein translatiert werden kann. Die effiziente Nutzung aller drei Spleißstellen ist daher ein entscheidender Punkt für die Bildung des Reporters und somit der Leistung des *gene trap*-Systems.

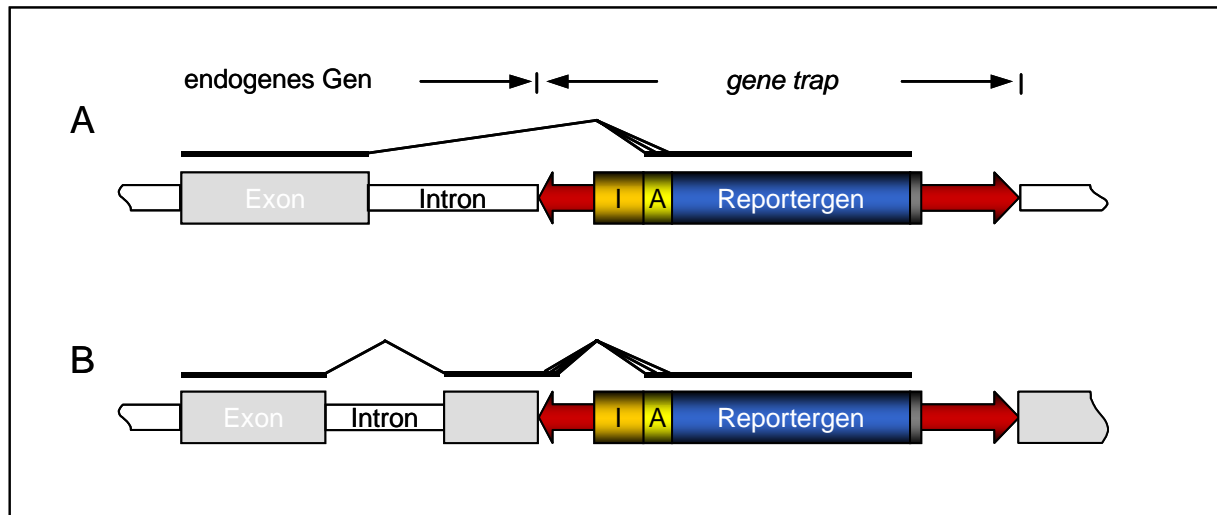


Abb. 1: Funktionales Konzept eines *gene trap*-Konstrukts

Schematisch abgebildet ist die Insertion eines *gene trap*-Konstrukts in ein Intron (A) oder Exon (B) eines endogenen chromosomalen Gens. Das *gene trap*-Konstrukt ist farblich, die Intronsequenzen als weiße und die Exonsequenzen als graue Boxen dargestellt. Das *gene trap*-Konstrukt enthält ein Intron (I) und eine dreifache Spleißakzeptorstelle (A) vor einem Reporter-gen. Die roten Pfeile auf beiden Seiten deuten ein Transposon als Basis des *gene trap*-Konstrukts an. Die unterschiedlichen Spleißmöglichkeiten zwischen endogenem Transkript und Reporter-gen-Transkript sind durch schwarze Linien symbolisiert.

Der Einsatz einer 3'Intronsequenz und dreier Spleißakzeptorstellen stromaufwärts des Reporter-gens kann die Zahl der nachweisbaren Integrationen des *gene trap*-Konstrukts erhöhen. Jeon *et al.* (2000) konnten in Reis zeigen, dass die Effizienz der Reporter-gen-Expression bei transgenen Linien mit drei putativen Spleißdonorstellen, dem 3'Bereich eines Introns und drei Spleißakzeptorstellen gefolgt von dem Reporter-gen im Vergleich zu Linien mit Konstrukten ohne 3'Intronsequenzen und Spleißstellen vor dem Reporter-gen verdoppelt werden konnte. In *Arabidopsis* stellten Nussaume *et al.* (1995) eine Steigerung der Pflanzen mit Expression des Reporter-gens von 4% in einem System ohne Intronsequenzen nach Bechtold *et al.* (1993) auf 20% bei einem System mit Intronsequenzen und dreifacher Spleißakzeptorstelle und somit eine Verfünffachung fest.

Spleißen bezeichnet den Prozess bei dem Intronsequenzen aus der *precursor*-mRNA ausgeschnitten und die Exons miteinander fusioniert werden. Eine Übersicht über die Spleißvorgänge in höheren Pflanzen geben Simpson und Filipowicz (1996). Die Spleißvorgänge in höheren Pflanzen unterscheiden sich von denen in Säugetieren. Das erklärt warum das Spleißen von heterologen Introns aus Vertebraten oder Hefe in transformierten Pflanzen in der Regel gar nicht oder nur sehr ineffizient erfolgt. Auch zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen bestehen Unterschiede in der Intronerkenung. Introns aus dikotylen Pflanzen werden in monokotylen Pflanzen korrekt und effizient prozessiert. Das Spleißen von monokotylen Introns in dikotylen Pflanzen hingegen erfolgt nur ineffizient oder überhaupt nicht.

Die Übergänge zwischen Exons und Introns sind stark konserviert. Die 5'Spleißdonorstelle hat in allen Eukaryoten meistens die Sequenz AG/GT (Simpson und Filipowicz 1996). Die stromabwärts im Intron folgenden Basen AAGT sind ebenfalls, allerdings nicht so stark, konserviert. Bei der 3'Spleißakzeptorstelle ist die Grenze zwischen Intron und Exon AG/GT am stärksten konserviert. Ein weiteres für den Spleißvorgang wichtiges Element ist die Verzweigungsstelle im Intron. Diese liegt in pflanzlichen Introns durchschnittlich 27 bp stromaufwärts der Spleißakzeptorstelle. In Hefe ist die Sequenz der Verzweigungsstelle mit TACTAAC stark konserviert. Für Pflanzen wurde von Simpson und Filipowicz (1996) die degenerierte Konsensussequenz CTRAY ermittelt, wobei auch weiter degenerierte Sequenzen eine Erkennung der Spleißakzeptorsequenz zulassen. Die Übereinstimmung der Sequenz der Verzweigungsstelle mit dem Konsensus hat jedoch einen großen Einfluß auf die Definition der 3'Spleißstelle (Simpson *et al.* 2002). Es wird angenommen, dass das Auffinden der Spleißakzeptorsequenzen durch einen *scanning*-Mechanismus erfolgt, bei dem präferentiell die erste Spleißakzeptorstelle stromabwärts der Verzweigungsstelle erkannt wird. In Vertebraten beeinflusst eine Polypyrimidin-Sequenz (*T-tract*) stromabwärts der Verzweigungsstelle die Auswahl der Spleißakzeptorstelle. Auch pflanzliche Introns enthalten AU-reiche Elemente, die eine wichtige Rolle bei der Introndefinition spielen. Es gibt Hinweise darauf, dass ein *T-tract* in Pflanzen existiert und wie bei Vertebraten einen Einfluss auf die Auswahl der Spleißakzeptorstelle hat (Simpson *et al.* 2002). Es ist gezeigt worden, dass die Effizienz der Intron-Prozessierung von der Qualität der Verzweigungsstelle zusammen mit dem stromabwärts gelegenen *T-tract* abhängt (Brown und Simpson 2002, zur Übersicht). Für ein effizientes Spleißen ist somit eine möglichst gute Übereinstimmung mit den Konsensussequenzen von Vorteil.

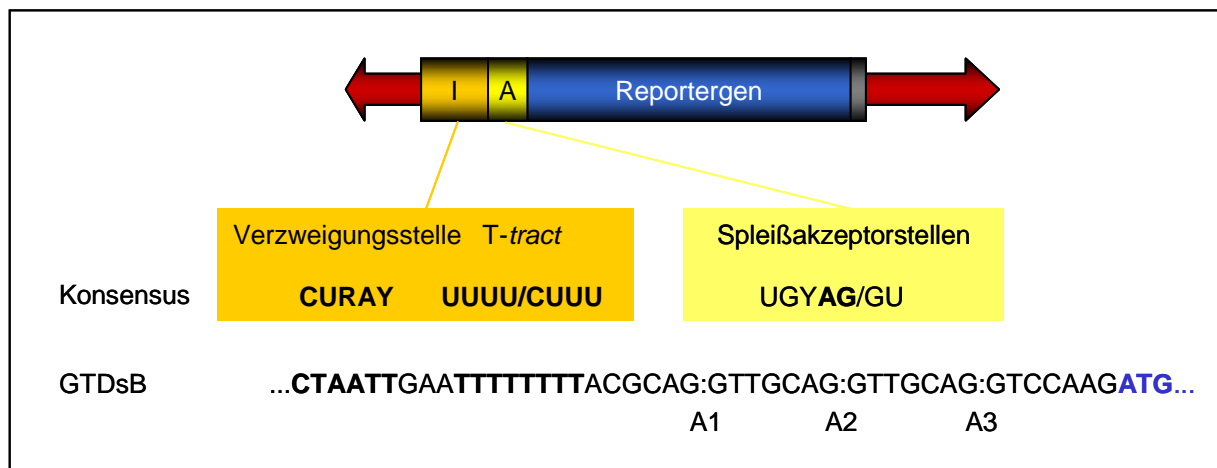


Abb. 2: Das *gene trap*-Konstrukt GTDsB

Schematisch abgebildet sind die für das Spleißen wichtigen Sequenzen wie Verzweigungsstelle, *T-tract* und die drei Spleißakzeptorstellen (A1-A3) des GTDsB-Konstrukts. Die zugehörigen Konsensussequenzen nach Simpson und Filipowicz (1996) sind angegeben. Das Startcodon des Reportergens ist blau markiert.

Bergmann und Lütticke (2004) konnten ein *gene trap*-Konstrukt entwickeln, das die optimale Erkennung der dreifachen Spleißakzeptorsequenz vor dem Reporter-gen in Gerste aufzeigt. Das als GTDsB (*gene trap Ds B*) bezeichnete Konstrukt basiert auf dem nicht-autonomen Transponierbaren Element *Ds* und wurde in dieser Arbeit für einen *gene trap*-Ansatz in Gerste eingesetzt. Durch eine Verlängerung des *T-tracts* der verwendeten

Intronsequenz des *Act1*-Gens aus Reis auf acht Basen und einer Annäherung des Signals an die Verzweigungsstelle konnte eine effiziente Prozessierung der dreifachen Spleißakzeptorstelle in GTDsB-transformiertem Gewebe erreicht werden. Die drei Spleißakzeptorstellen von GTDsB A1-A3 wurden dem Konsensus für monokotyle Pflanzen nach Simpson und Filipowicz (1996) angepasst und befinden sich jeweils in einem Abstand von sieben Basen. Es konnte gezeigt werden, dass die Spleißakzeptorstelle A1 präferentiell und effizient genutzt wird. Die Spleißakzeptorstellen A2 und A3 wurden beide in einer elffach reduzierten, annähernd gleichen Frequenz genutzt. Zum ersten Mal konnte in Pflanzen die Nutzung der Spleißakzeptorstelle A3 eines *gene trap*-Konstrukts gezeigt werden.

Das Reportergen in GTDsB ist das bakterielle Gen für die β -Glukuronidase (*uidA* oder *gusA*, im Folgenden als *gus* bezeichnet). Dessen Verwendung als Reportergen ist in Pflanzen sehr verbreitet. Die Expression von *gus* kann durch histochemische Färbung mit einem geeigneten Substrat sichtbar gemacht werden (Jefferson 1987). Das GUS-Protein ist sehr stabil und toleriert lange N-terminale Fusionen (Kavanagh *et al.* 1988). Dies ist ein wichtiger Punkt, da es aufgrund des funktionalen Konzepts von *gene trap*- aber auch *promotor trap*-Konstrukten neben einer transkriptionalen Fusion von endogenen mit Reportergen-Sequenzen auch zu einer translationalen Fusion kommen kann. Der Nachweis der β -Glukuronidase ist sehr sensitiv (Jefferson *et al.* 1987, Lindsey *et al.* 1993), so dass die GUS-Aktivität auch in einzelnen Zellen detektiert werden kann.

Um *gene trap*-Konstrukte für die Insertionsmutagenese nutzbar zu machen und in Pflanzengenomen zu verteilen, sind die beiden wichtigsten Alternativen T-DNA-Transfer und Transponierbare Elemente. Ein Vorteil der Transponierbaren Elemente gegenüber T-DNA beim Einsatz in den großen Genomen der Gräser ist die inhärente Präferenz für die Insertion in putative Gensequenzen. Für Transposons der *Ac/Ds*-, *En/Spm*- und *Mu*-Familien aus Mais wurde in Mais die Tendenz gezeigt, bevorzugt in unmethylierte DNA-Sequenzen mit geringer Kopienzahl zu inserieren (Bennetzen 1985, Chen *et al.* 1987, Cone *et al.* 1988, Bennetzen *et al.* 1994, Cresse *et al.* 1995). Unmethylierte Regionen des Mais-Genoms sind generell mit regulatorischen und codierenden Sequenzen assoziiert (Antequera und Bird 1988, Bennetzen *et al.* 1994). Eine mögliche Erklärung für diese Präferenz der mobilen Elemente wäre die bessere Zugänglichkeit dieser DNA-Regionen aufgrund der offenen Struktur von genreichen Chromosomensegmenten (Yamazaki 2001).

Die eukaryotischen Transposons lassen sich anhand des Transpositionsmechanismus in zwei Klassen einteilen (Kunze *et al.* 1997, zur Übersicht). Retrotransposons (Klasse I-Elemente) transponieren über eine RNA-Zwischenform. DNA-Transposons (Klasse II-Elemente) transponieren über die physikalische Exzision und Reintegration in neue Positionen. Dieser Transpositionsmechanismus wird als *cut and paste* bezeichnet (Greenblatt und Brink 1962, Saedler und Nevers 1985). Die DNA-Transposons besitzen strukturelle Merkmale, die für die Transposition essentiell sind. So befinden sich am 5' und 3' Transposonende sogenannte *terminal inverted repeats* (TIR). Sie gehören, wie weitere Sequenzmotive in den subterminalen Regionen, zu den *cis*-Determinanten des Transpositionsprozesses. Transponierbare Elemente codieren für ein Protein oder mehrere Proteine, die für die

Transposition notwendig sind. Die Transposition ist das Ergebnis der Interaktion von der *in trans*-agierenden Transposase mit den *cis*-Determinanten des Transposons.

Basierend auf der Sequenz der TIR und Homologien zwischen den Transposase-Proteinen können eine Vielzahl der pflanzlichen Transposons in die *Ac*-Überfamilie oder die *En/Spm*- bzw. CACTA-Überfamilie eingeordnet werden. Die *Mutator*-Elemente aus Mais bilden eine distinkte Transposonfamilie mit langen TIR und spezifischen Charakteristika der Transposition. Die *Ac*- und *En/Spm*-Überfamilien beinhalten nicht nur transponierbare Elemente aus Mais sondern auch aus anderen Pflanzenspezies. Eine Übersicht über die transponierbaren Elemente in Pflanzen geben Kunze *et al.* (1997).

Innerhalb einer Elementfamilie gibt es autonome, defekte und nicht-autonome Elemente (Kunze *et al.* 1997, zur Übersicht). Die autonomen sowie manche defekten Elemente codieren die *in trans*-agierende Transposase. Die defekten Elemente sind aufgrund von Veränderungen in den *cis*-Determinanten immobilisiert. Nicht-autonome Elemente bilden keine Transposase, besitzen aber funktionsfähige *cis*-Determinanten. Sie können transponieren, wenn die Transposase von einem autonomen Element der gleichen Elementfamilie *in trans* bereitgestellt wird.

Die *Ac/Ds*-Transposonfamilie aus Mais beinhaltet die autonomen Elemente *Activator* (*Ac*) und die nicht-autonomen *Dissociation*-Elemente (*Ds*-Elemente) (Döring und Starlinger 1986, zur Übersicht).

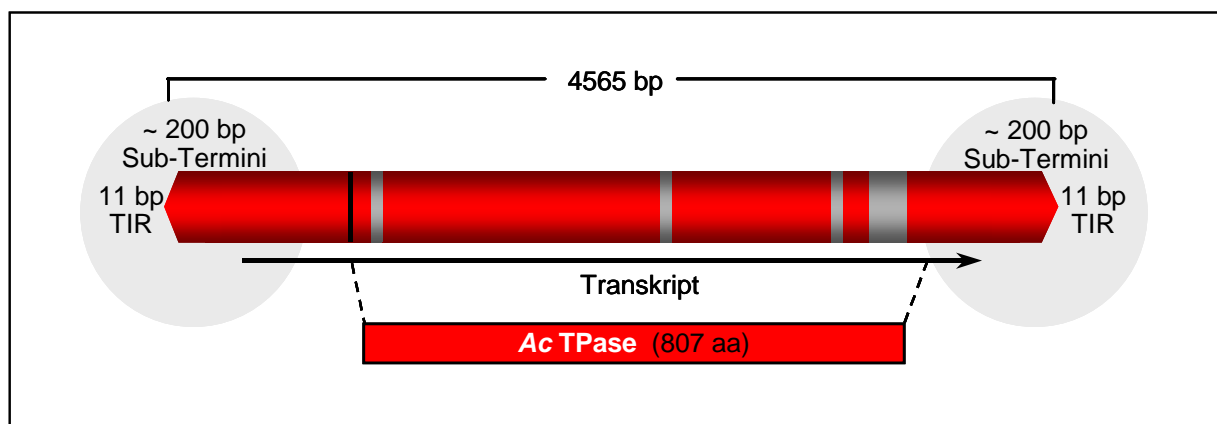


Abb. 3: Schematische Darstellung des autonomen *Ac*-Elements aus Mais

Das *Ac*-Element weist eine Gesamtlänge von 4565 bp auf. Die *cis*-Determinanten, 11 bp TIR (*terminal inverted repeats*) und 180 bp subterminale Sequenzen, sind schematisch gezeigt. Das durch einen Pfeil symbolisierte Transkript codiert für eine Transposase (*AcTPase*) von 807 Aminosäuren (aa).

Das autonome *Ac*-Element (Abb. 3) hat eine Länge von 4565 bp (Pohlmann *et al.* 1984, Müller-Neumann *et al.* 1984). Die 3,5 kb lange mRNA (Kunze *et al.* 1987, Finnegan *et al.* 1988) codiert für ein 807 Aminosäuren-großes Protein, die *Ac*-Transposase. Diese ist notwendig und hinreichend, um das Transposon *in trans* zu aktivieren (Coupland *et al.* 1988, Houba-Hérin *et al.* 1990, Kunze *et al.* 1993). Eine modifizierte *Ac*-Transposase mit einer N-terminalen Deletion von 102 Aminosäuren (*AcΔ102*) führte in Petunien-Protooplasten (Houba-Hérin *et al.* 1990) und transgenem Tabak (Kunze *et al.* 1993) zu einer erhöhten Transpositionsfrequenz von nicht-autonomen Elementen. Das *Ac*-Element trägt am 5' und am 3' Ende 11 bp-lange, umgekehrte Wiederholungssequenzen (*terminal inverted repeats*, TIR)

(Pohlmann *et al.* 1984, Coupland *et al.* 1989), die in einer Base asymmetrisch sind. Die intakte Basenfolge dieser TIR ist eine Voraussetzung für das Transpositionereignis (Hehl und Baker 1989, Healy *et al.* 1993). Für die Transposition sind auch etwa 200 bp der subterminalen 5' und 3'Regionen obligatorisch (Coupland *et al.* 1989). Bei der Insertion in eine neue genomische Position wird eine *target site duplication* (TSD) von 8 bp generiert (Pohlmann *et al.* 1984), die die Elemente direkt flankiert. Die 8 bp-TSD ist für die gesamte *Ac*-Überfamilie charakteristisch. Die nicht-autonomen *Ds*-Elemente exprimieren keine Transposase. Es handelt sich dabei um Derivate der autonomen *Ac*-Elemente mit internen Deletionen variabler Länge.

Es konnte gezeigt werden, dass *Ac* in vielen heterologen Pflanzen transponiert (Kunze 1996, zur Übersicht). Eine Transposition von *Ac* in Getreide konnte erstmals 1991 für Reis gezeigt werden (Izawa *et al.* 1991). In Gerste konnte die Transposition von autonomen *Ac*-Elementen von Scholz *et al.* (2001) und von nicht-autonomen durch Koprek *et al.* (2000) gezeigt werden. Die Einführung von Transposons in heterologen Pflanzen hat ihren Einsatz für die Identifizierung von Genen ermöglicht. Das *Ac*-Element wurde sehr erfolgreich zur Insertionsmutagenese in verschiedenen heterologen Systemen wie z. B. Tabak, *Arabidopsis thaliana*, Tomate und Flachs (zur Übersicht Kunze *et al.* 1997) eingesetzt. Auch in der monokotylen Pflanze Reis wurden verschiedene Systeme zur Insertionsmutagenese entwickelt (Enoki *et al.* 1999, Chin *et al.* 1999, Greco *et al.* 2000). Bereits eine Reihe von Genen konnte mit Hilfe von Transposons isoliert werden (zur Übersicht Balcells *et al.* 1991, Gierl und Saedler 1992, Kunze *et al.* 1997). Im sogenannten *forward genetics*-Ansatz führt die Identifizierung einer Transposon-induzierten Mutante zur Isolierung der das Transposon flankierenden, genomischen Sequenzen. Das Verfahren der *reverse genetics* benutzt Transposon-haltige Populationen für die genetische Definition der Genfunktion, ausgehend von beliebigen DNA-Sequenzen (zur Übersicht Maes *et al.* 1999). Diese DNA-Sequenzen werden durch differentielle oder heterologe *screening*-Verfahren erhalten oder im Rahmen von Genomprojekten generiert. Im *reverse genetics*-Ansatz von Greco *et al.* (2001) wird ein autonomes *Ac*-Element für die Insertionsmutagenese in Reis eingesetzt. Die flankierenden Sequenzen von transponierten *Ac*-Elementen werden isoliert und mit bekannten Sequenzen von Reis aus Datenbanken verglichen. So kann die Position der Transposon-Insertion in sequenzierten Genen präzise bestimmt und Pflanzen mit Insertionen in Zielgenen können auf sichtbare mutante Phänotypen untersucht werden.

Die Eigenschaft der Transposons, dass nichtautonome Elemente *in trans* von einer Transposase bewegt werden können, ermöglicht den Einsatz von Zweikomponenten-Systemen (Abb. 4). Dazu werden zum einen Linien hergestellt, die ein Transposase-exprimierendes Konstrukt enthalten. Zum anderen werden Linien mit einem nichtautonomen, beweglichen Element, z.B. einem *gene trap*-Konstrukt, transformiert. Durch Kreuzung dieser Linien kommen beide Komponenten zusammen, so dass die Transposition des nichtautonomen Elements möglich wird. Der Vorteil eines Zweikomponenten-Systems ist, dass in den nachfolgenden Generationen aufgrund der Vererbung die Transposase-exprimierenden von den nichtautonomen Konstrukten getrennt werden können. Somit werden transponierte Elemente an ihren neuen Positionen im Genom stabilisiert und können genau

analysiert werden. Eine Remobilisierung ist durch erneutes Einkreuzen der Transposase möglich. Das von Koprek *et al.* (2000) entwickelte Zweikomponenten-System zur Insertionsmutagenese in Gerste besteht aus dem nichtautonomen Element *Ds*, welches nur in Gegenwart der zweiten, Transposase-exprimierenden Komponente transponieren kann. Es konnten mutante Phänotypen identifiziert werden, in welchen transponierte *Ds*-Elemente mit dem neuen Phänotyp co-segregieren.

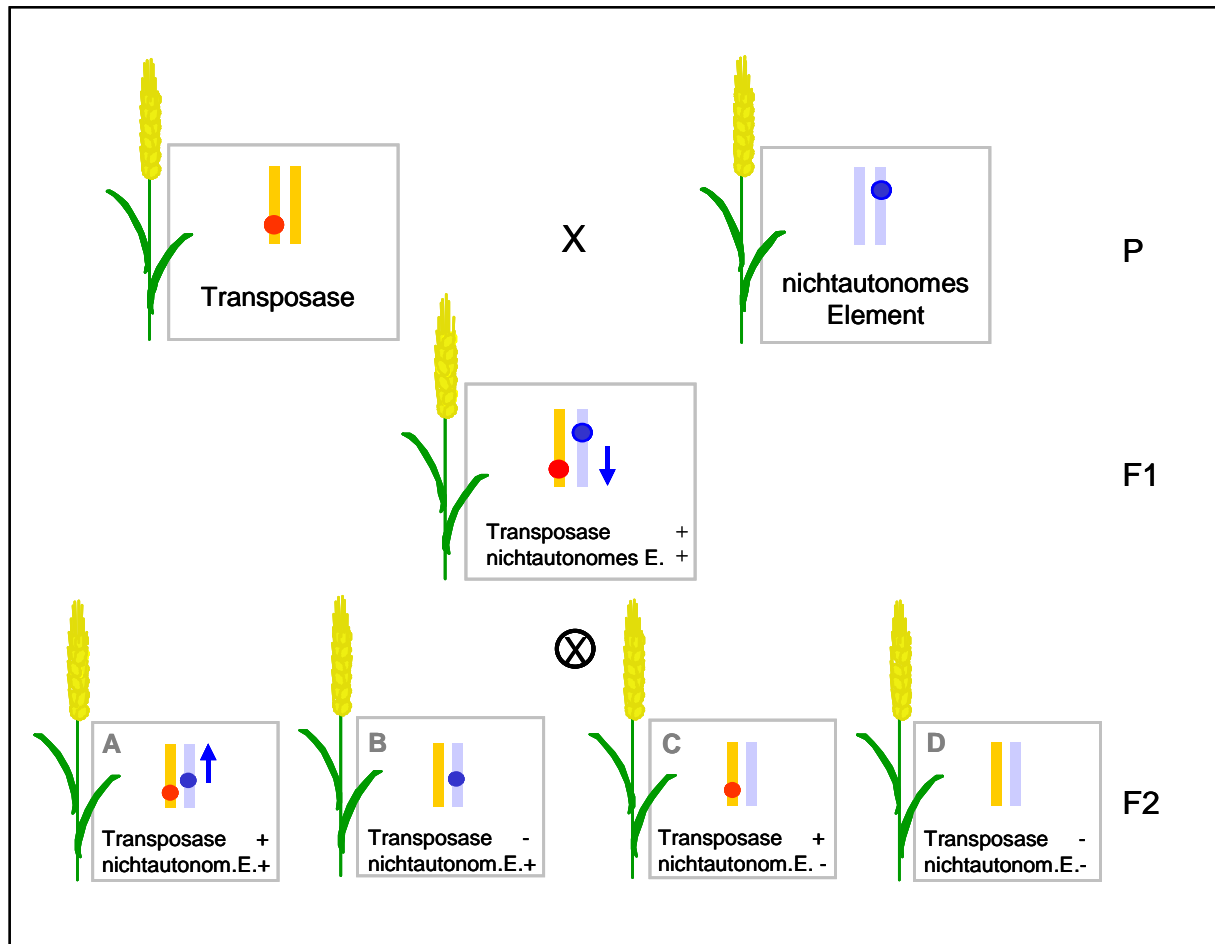


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Zweikomponenten-Systems

Schematisch dargestellt sind Chromosomen von Transposase-exprimierenden Linien (orange) und Linien mit nichtautonomen Elementen (hellblau). Das Transposase-Konstrukt und das nichtautonome Konstrukt sind als roter bzw. blauer Punkt abgebildet. Der blaue Pfeil symbolisiert eine mögliche Transposition des nichtautonomen Elements. Werden Transposase-exprimierende Linien mit Linien gekreuzt, die ein nichtautonomes Element, z. B. ein *gene trap*-Konstrukt, enthalten, kann in der folgenden Generation (F1) die Transposition des nichtautonomen Elements erfolgen. Nach Selbstung kommt es in der nächsten Generation (F2) zur Segregation der Transposase- und Transposase-abhängigen Konstrukte. **A** Das nichtautonome Element kann weiter transponieren. **B** Das nichtautonome Element ist an seiner genomischen Position stabilisiert. **C** Nur das Transposase-Konstrukt liegt vor. **D** Beide Komponenten wurden nicht vererbt.

Ein wichtiger Faktor für die Isolierung von Genen in einem Transposon-basierten Ansatz ist die Transpositionsfrequenz. Diese variiert stark in verschiedenen heterologen Spezies und wird durch die Anzahl an *Ac*-Elementen sowie deren genomischer Position (Kunze *et al.* 1997) beeinflusst.

Die Transpositionsfrequenz von *Ac/Ds*-Elementen in Gerste (Koprek *et al.* 2000, Scholz *et al.* 2001) ist mit der Transpositionsfrequenz von *Ac/Ds*-Elementen in anderen monokotylen Systemen wie Reis vergleichbar (Chin *et al.* 1999, Enoki *et al.* 1999, Kolesnik *et al.* 2004). In *Arabidopsis* ist die Aktivität des autonomen *Ac*-Elements (van Sluys *et al.* 1987, Schmidt und Willmitzer 1989, Dean *et al.* 1992) und die Frequenz der Transaktivierung von *Ds* (Bancroft *et al.* 1992) sehr niedrig. Die Exzisionsfrequenz von *Ac/Ds*-Elementen in *Arabidopsis* kann allerdings durch die Expression der *Ac*-Transposase unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors gesteigert werden (Scofield *et al.* 1992, Grevelding *et al.* 1992, Swinburne *et al.* 1992, Honma *et al.* 1993). Die niedrigen Transpositionsfrequenzen in *Arabidopsis* werden in Zusammenhang mit inkorrektur Prozessierung des *Ac*-Transkripts gebracht (Martin *et al.* 1997, Jarvis *et al.* 1997).

Es wird diskutiert, dass die chromosomale Position des Elements die Transpositionsfrequenz beeinflussen kann. Die durchschnittliche Exzisionsfrequenz von 2 bis 5% für *Ac/Ds*-Elemente in Tabak ist vergleichbar mit der in Mais. Sie kann allerdings in unabhängigen Tabaklinien von 0 bis 83% stark variieren (zur Übersicht Kunze und Weil 2002). Auswirkungen der chromosomalen Position von *Ds*-Elementen auf die Transposition suggerieren, dass die Chromatinstruktur einen Einfluss auf die Bindung der *Ac*-Transposase hat (Bancroft and Dean 1993). Ein weiterer Punkt ist, dass die DNA-Bindung durch die Transposase von dem Status der Methylierung der Ziel-DNA abhängig ist (Kunze 1996). In den hexameren Motiven AAACGG in den subterminalen Sequenzen an beiden Enden von *Ac*, die von der Transposase erkannt werden (Kunze und Starlinger 1989), befinden sich potentielle Methylierungsstellen. Bei Transposon-basierten Ansätzen steht die Anzahl der Transposase-exprimierenden Elemente in unmittelbarem Zusammenhang mit der Transpositionsfrequenz und dem Zeitpunkt der Transposition. Für die Insertionsmutagenese besonders interessant sind germinale Transpositionereignisse. Diese führen zu einer hohen Anzahl an Nachkommen mit unabhängigen Insertionen des Transposons. Die Gameten von Pflanzen entstehen spät in der Entwicklung aus somatischen Zellen, so dass somatische Mutationen an die Nachkommen weitergegeben werden können. Ein klassisches Beispiel dafür ist die Weitergabe von Reversionen *Ac/Ds*-induzierter Mutationen an die Nachkommen. Ein nicht-stabiler Mutant kann stabile, revertierte Gameten produzieren, wenn die Exzision der Elemente während der somatischen Entwicklung erfolgt. Häufige und frühe Reversionen während der somatischen Entwicklung resultieren in einer hohen Frequenz an revertierten Gameten (Eisses *et al.* 1997). In Mais haben transponierbare Elemente charakteristische Frequenzen von somatischer und Keimbahn-kompetenter Reversion. Somatische Exzision von *Ac/Ds*-Elementen aus dem *waxy*-Locus (Baran *et al.* 1992, Eisses *et al.* 1997) oder dem *bronze* Locus (Heinlein 1996) ist im Hinblick auf die Regulation der Transposition gut untersucht worden. Die somatische und Keimbahn-kompetente Transposition sowie die Effekte der *Ac*-Dosis auf Frequenz und Zeitpunkt von germinalen *Ac*-Transpositionen wurden mit Hilfe von Streptomycin-Resistenz-Assays in *Arabidopsis* und Tabak analysiert (Jones *et al.* 1989, Bancroft *et al.* 1992, Keller *et al.* 1993). Die Erhöhung der Kopienzahl von *Ac* in Tabak erhöht die Frequenz von unabhängigen Transpositionen in Keimbahn-kompetenten Zellen und führt auch zu frühen Transpositionereignissen, welche an mehrere Nachkommen weitergegeben werden. Aus Mais ist für *Ac* ein negativer Dosis-effekt bekannt. Eine Erhöhung der Anzahl an *Ac*-Kopien im Endosperm resultiert in einer in der Entwicklung verzögerten Transposition und in einer

Abnahme der Transpositionsfrequenz (McClintock 1948, 1951). Der negative Dosisseffekt scheint für Mais spezifisch und eine Funktion der Konzentration der Transposase zu sein. Die Anzahl der *Ds*-Elemente hingegen zeigt keinen Einfluss (Dooner *et al.* 1986, Bancroft and Dean 1993). In *Arabidopsis* (Keller *et al.* 1992; Dean *et al.* 1992, Bancroft and Dean 1993) und Tabak (Keller *et al.* 1993) wurde für *Ac* ein positiver Dosisseffekt beschrieben. Hier steigt die Transpositionsfrequenz mit zunehmender Konzentration der Transposase.

Der Vorteil, den *gene trap*-Systeme gegenüber dem klassischen Ansatz der Insertionsmutagenese bieten, ist die indirekt visualisierte Expression eines Reporters, die wie ein dominanter Phänotyp betrachtet und in weiterführenden Analysen eingesetzt werden kann. Das von Sundaresan *et al.* (1995) entwickelte *gene trap*-System in *Arabidopsis* basiert auf den *Ac/Ds*-Transposons. Stromaufwärts von dem *gus*-Reporter befinden sich die 3' Sequenzen des vierten Introns des *GPA1*-Gens aus *Arabidopsis*, sowie zwei zusätzliche künstliche Spleißakzeptorstellen. In 26% (64/246) der untersuchten *gene trap*-Linien mit unabhängigen Transpositionen des *gene trap*-Konstrukts konnte eine Expression des Reportergens detektiert werden. Die GUS-Expression trat in Blüten oder Keimlingen auf und zeigte ein organ-, gewebe-, zelltyp- oder entwicklungspezifisches Muster. Die Reportergenexpression kann zur Identifizierung und Isolierung der Gene mit der *gene trap*-Insertion führen (Springer 2000, zur Übersicht). Als erstes wurde mit dem *gene trap*-System von Sundaresan *et al.* (1995) das Gen *PROLIFERA* identifiziert (Springer *et al.* 1995). Dieses Gen wäre mit klassischer Insertionsmutagenese nicht identifiziert worden, da die *gene trap*-Insertion einen frühen letalen Phänotyp zur Folge hat. Von Chin *et al.* (1999) wurde ein *gene trap*-System für Reis entwickelt. Dieses basiert ebenfalls auf den *Ac/Ds*-Transposons. Stromaufwärts des *gus*-Reporters befinden sich 3' Sequenzen des dritten Introns von *Adh1* aus Mais mit der künstlichen zweifachen Spleißakzeptorstelle nach Sundaresan *et al.* (1995). Ein nicht auf einem Transposon basierendes *gene trap*-System für Reis wurde von Jeon *et al.* (2000) vorgestellt. Die Insertionsmutagenese erfolgt über die zufällige Integration des T-DNA-Vektors. Sequenzen des dritten Introns des *OsTubA1*-Gens aus Reis werden von der künstlichen, zweifachen Spleißakzeptorstelle nach Sundaresan *et al.* (1995) und dem *gus*-Reporter gefolgt. Hiwatschi *et al.* (2001) beschreiben ein *gene trap*-System in dem Moos *Physcomitrella patens*. Die Verteilung von *gene trap*-Konstrukten im Moosgenom erfolgte über homologe und nicht-homologe Rekombination. *Gene trap*-Systeme in Pflanzen haben bereits zur Identifizierung und Isolierung einer Reihe von Genen geführt (Springer *et al.* 1995, Dubreucq *et al.* 2000, Jung *et al.* 2003).

Gerste ist eine ökonomisch relevante Pflanze, welche in Deutschland im Rahmen des GABI-Projekts des BMBF als Modellsystem gilt. Das Genom der Gerste ist mit seinen 4873 Mbp ca. 40 Mal größer als das Genom von *Arabidopsis thaliana* (Armuganathan und Earle 1991). Die sehr großen Genome der Gräser können auf repetitive Sequenzen zurückgeführt werden, wie aus Mais bekannt ist (Springer *et al.* 1994, Bennetzen *et al.* 1994). Mehr als 50% des Genoms von Mais besteht aus repetitiven DNAs, die zwischen den Genen inseriert sind. Es handelt sich dabei hauptsächlich um verschachtelte Retrotransposons (Shepherd *et al.* 1982, White *et al.* 1994, SanMiguel *et al.* 1996). Für Gerste existieren viele Werkzeuge der modernen Molekularbiologie wie eine *bacterial artificial chromosome* (BAC)-Bibliothek

(Yu *et al.* 2000), mehr als 360000 *expressed sequence tags*(EST) (Wannamaker und Close 2003) und ein 22K *GeneChip* mit 21439 nicht-redundanten Sequenzen (Close *et al.* 2004). Seit Mitte der 90iger Jahre kann Gerste biolistisch stabil transformiert werden (Jähne *et al.* 1994, Wan und Lemaux 1994).

Das Ziel dieser Arbeit war die Erarbeitung von Erkenntnissen, die einen effizienten Einsatz der *gene trap*-Technologie in Gerste mit dem für monokotyle Pflanzen optimierten *gene trap*-Konstrukt GTDsB (Bergmann und Lütticke 2004) vorbereiten.

Dazu wurden *gene trap*(GT)-Linien der Gerste etabliert und in diesen die für den *gene trap*-Ansatz relevanten Eigenschaften der Transposition des GTDsB-Konstrukts und der Expression des Reportergens untersucht. Langfristiges Ziel der Arbeitsgruppe ist die Nutzung der *gene trap*-Technologie für die Untersuchung entwicklungspezifischer Vorgänge bei der Kornentwicklung von Getreide.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Applichem (Darmstadt, D), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D).

Die Herstellung von Lösungen und Medien erfolgte mit deionisiertem Wasser der Qualität *aqua bidest.* (Milli-Q Water System, Millipore, Bedford, MA, USA). Lösungen und Medien wurden nach Bedarf autoklaviert (20 Min., 120°C, 2x10⁵ Pa) oder sterilfiltriert (MillexGP Porendurchmesser 0,22 µm, Millipore, Bedford, MA, USA, Schleicher und Schüll, Dassel, D, Porendurchmesser 0,25 µm).

Allgemein gebräuchliche molekularbiologische Lösungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Es wurden Nylonmembranen von Amersham Biosciences Europe (Freiburg, D), Blotting Papier von Schleicher und Schüll (Dassel, D) und Filmmaterial der Firmen Mitsubishi (Kyoto, Japan) und Amersham Biosciences Europe (Freiburg, D) verwendet.

2.1.3 Enzyme und Kits

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe, D), MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D) und Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, D) bezogen.

DIG-[11]-dUTP (alkali-labil), Antikörper Anti-Digoxigenin AP Fab-Fragmente und CSPD wurden von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, D) bezogen.

Es wurde das TOPO[®] TA Cloning Kit von Invitrogen (Karlsruhe, D) verwendet.

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden das Montage DNA Gel Extraktion Kit (Millipore, Bedford, MA, USA) und Recochips (TaKaRa, Shiga, Japan) eingesetzt. Die Aufreinigung von cDNA-Synthese- und PCR-Produkten erfolgte mit Montage PCR (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.1.4 Größenstandards

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen erfolgte mit dem λ -DNA/*Eco*130I [*Sty*I]-Marker, der GeneRuler[™] 50bp DNA-Leiter und der GeneRuler[™] 100 bp Plus DNA-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D). Bei Southernblotanalysen erfolgte die DNA-Größenbestimmung mit dem DIG VII- und dem DIG VIII-Marker (Roche

Molecular Biochemicals, Mannheim, D). Die Größenbestimmung von RNA in Northernblotanalysen erfolgte mit der RNA-Ladder High Range (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D).

2.1.5 Vektoren

Zur Klonierung, als PCR-Matrizen, als Positivkontrollen und zur Transformation von Pflanzen wurden folgende Vektoren verwendet (alle Vektoren enthalten das *amp^r*-Gen):

pGTDsB	Bergmann und Lütticke (2004) Modifizierter Vektor pBluescriptSK ⁺ (Stratagene, Heidelberg, D), der an Position 716 das 3465 bp-lange GTDsB-Konstrukt enthält.
pAcΔ102 (pAH2)	Hoffmann und R. Kunze (Botanisches Institut Köln, D) Modifizierter Vektor pAc, der eine 412 bp-Deletion im <i>Ac</i> -Element (Position 988-1400; Acc. No. AC X01380) trägt. Die drei letzten Basen der untranslatierten Leader-Sequenz sind zu ACC (Position 1405 bis 1408) verändert.
GUS AB-M	Herrmann Schmidt (DNA-Cloning-Service, Hamburg, D) Der bakterielle Vektor GUS-AB-M enthält <i>gus</i> zwischen dem T7- und T3-Promotor.
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Invitrogen (Karlsruhe, D) Bakterieller Klonierungsvektor für PCR-Produkte
pUCpat	P. Eckes (Hoechst AG, Frankfurt, D) <i>pat</i> -Gen (Basta [®] -Resistenz), synthetisches PPT-Acetyltransferase-Gen zwischen 35S-Promotor und 35S-Terminator

2.1.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers.net (Ulm, D) und Invitrogen (Karlsruhe, D) synthetisiert. Der Primer CB3 wurde von Herrmann Schmidt (DNA-Cloning-Service, Hamburg, D) zur Verfügung gestellt.

Primer für die Genotypisierung der GT-Linien:

cw1: 5'-TGCGGTAAGGATCAACAACAC-3'

cw2: 5'-TTCAGCTCCAAAGACAAAGACAAC-3'

GTDs1: 5'-TTTCTTTCTTCTTTTTGTGGGTAG-3'

GTDs2: 5'-CTTTGCCGTAATGAGTGACC-3'

Hvwaxy1: 5'-AACGCGCCGCTAGCTCACCAGAT-3'

Hvwaxy2: 5'-CAGCATACGCCAGACCACCATTG-3'

Primer für RT-PCR:

GUSKL1: 5'-GCCGATGTCACGCCGTATGTTATT-3'
 GUSKL2: 5'-CTGTTGCCCCCTTCACTGCCACTG-3'
 GAPDHup: 5'-TTCGTCAAGCTTGTCTCGTGGTAT-3'
 GAPDHlow: 5'-CAACTCGGTGCGGAAAAACAG-3'
 trans1_up: 5'-CTGCGTTTCGATGCGGTCCTC-3'
 trans1_low: 5'-TTCACGGGTTGGGGTTTCTACAGG-3'
 trans2_up: 5'-TCGTGCGCTCTCCTGTTCCG-3'
 trans2_low: 5'-AATTGCCCGGCTTTCTTGTAACG-3'

Primer für die 5'RACE:

CB3: 5'-CCCCCCCCTCCCCCCC-3'
 T5: 5'-GGAATTTAGCCGTAGCGATTGACCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
 T6: 5'-GGAATTTAGCCGTAGCGATTGACCG-3'
 R-GUS-3: 5'-GAATATCTGCATCGGCGAAC-3'
 R-GUS-D: 5'-CGCTGGCCTGCCAACCTTT-3'
 R-GUS-C: 5'-GCACAGCAATTGCCCGGCTT-3'
 R-GUS-B: 5'-CGCGCTTTCCACCAACGCT-3'
 R-GUS-A: 5'-GCCACAGGCCGTGAGTTT-3'
 R-GUS-T3: 5'-CGCTTTCCACCAACGCTGAT-3'
 R-GUS-T7: 5'-AATTGCCCGGCTTTCTTGTAACG-3'
 R-GUS-2: 5'-GCTTTCCACCAACGCTGAT-3'
 pBlue_low1: 5'-CTTCCGGCTGGCTGGTTTATTG-3'
 pBlue_low2: 5'-CGTGGGTCTCGCGGTATCATTG-3'
 pBlue_low3: 5'-GATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGT-3'
 pBlue_low4: 5'-TGCCGGATCAAGAGCTACCAACT-3'
 pBlue_low5: 5'-CTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC-3'
 pBlue_low6: 5'-CCGCCTACATACCTCGCTCTGCTA-3'

Primer für die DIG-Markierung von DNA-Fragmenten:

GUS1: 5'-CAGGAAGTGATGGAGCATCAG-3'
 GUS2: 5'-TCGTGCACCATCAGCACGTTA-3'
 Ac5: 5'-AGTTGATGTCTACCACAAGAG-3'
 Ac6: 5'-CTAACCACTTCATCGTACTTA-3'

Standardprimer für die Sequenzierung:

M13-Forward(-20): 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
 M13-Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

2.1.7 Sonden

Es wurden die Digoxigenin-markierten Sonden Ac5/6, GUS1/2 und 35bp-GUS-Oligo verwendet. Die Sonde Ac5/6 hat eine Länge von 738 bp und wurde in einer PCR (2.2.10) mit

DIG-[11]-dUTP markiert. Sie wird zum Nachweis der Transposase-Konstrukte eingesetzt und bindet vollständig im *cwAc*-Konstrukt sowie partiell (379 der 738 Basen) im *cwAc* Δ 102-Konstrukt. Die Sonde GUS1/2 hat eine Länge von 637 bp und bindet von Position 771 bis 1408 im *gusA*-Gen des GTDsB-Konstrukts. Die 35bp-GUS-Oligo-Sonde (5'-(Digoxigenin)TGTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATC-3') wurde von der Firma Biometra (Göttingen, D) hergestellt und bindet von Position 469 bis 503 in der *gusA*-Sequenz des GTDsB-Konstrukts.

2.1.8 Pflanzenmaterial

Die Experimente wurden mit Sommergerste (*Hordeum vulgare* L.), Kultivar Golden Promise, durchgeführt. Die Gerstenpflanzen wurden entweder nach Aussaat in Erde oder nach *in vitro*-Kultur von isolierten Embryonen (2.2.1) in einem Gewächshaus mit folgenden, kontrollierten Bedingungen gehalten: 18°C Tag, 16°C Nacht, 16 Stunden Licht (23000-25000 lux).

Neben den im Folgenden beschriebenen Transposase-exprimierenden Linien (2.1.8.1) und GTDsB-Linien (2.1.8.2) sowie dem Golden Promise-Wildtyp, wurde für molekulare Analysen die konstitutiv *gus*-exprimierende, transgene Linie 9/2/6 eingesetzt. Diese enthält den Vektor pAct aa mit einer Expressionskassette aus *actin*-Promotor, *gus* (*uidA*) und *nos*-Terminator (Spickernagel 1999).

2.1.8.1 Transposase-Linien

Zu Beginn dieser Arbeit waren vier unabhängige Transposase-exprimierende Linien (TPase-Linien, Tab. 1) vorhanden (Scholz 2000, Friedrich, persönliche Mitteilung). Die vier TPase-Linien enthalten eine bis vier Kopien eines immobilisierten Transposase-Konstrukts. Zwei der TPase-Linien, DHcw21 und DHcw42, sind doppelt-haploid (Friedrich, persönliche Mitteilung). Die Linien DHcw21 und cw74 enthalten ein *Ac*-Konstrukt mit einer N-terminalen Deletion der Transposase von 102 Aminosäuren. Durch *Embryo Rescue* (2.2.1) wurden von diesen vier Linien insgesamt 136 Nachkommen erzeugt. Damit von jeder der unabhängigen TPase-Linien genug Pflanzen in dem richtigen Stadium für die Kreuzungen mit GTDsB-Linien (2.2.2) zur Verfügung stehen, erfolgte die Aufzucht der Nachkommen sukzessive über einen Zeitraum von neun Wochen.

Tab. 1: TPase-Linien

TPase-Linie	Konstrukt	Kopien TPase	Anzahl Pflanzen
DHcw21	<i>cwAc</i> Δ 102	1	34
cw34	<i>cwAc</i>	4	30
DHcw42	<i>cwAc</i>	2	34
cw74	<i>cwAc</i> Δ 102	4	38
			Summe: 136

2.1.8.2 GTDsB-Linien

Für diese Doktorarbeit standen 34 unabhängige GTDsB-T0-Linien zu Verfügung (Lütticke, persönliche Mitteilung). Sie waren nach co-Transformation von *Gerstenskutella* mit den Vektoren pGTDsB (2.1.5) und pUCpat (2.1.5) regeneriert und mit BASTA[®] selektiert worden. Erste Southernblotanalysen dieser GTDsB-T0-Linien haben gezeigt, dass in allen mindestens ein GTDsB-Konstrukt vollständiger Länge integriert ist (Lütticke, persönliche Mitteilung). Die in dieser Arbeit verwendeten GTDsB-Linien sind im Ergebnisteil unter 3.1.1 beschrieben.

2.1.9 Bakterien

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurden die Bakterienstämme TOP10F⁷ und TOP10F (*E. coli*) von Invitrogen (Karlsruhe, D) verwendet.

2.1.10 Analysesoftware und Datenbanken

Die Bearbeitung von DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Softwarepaket DNASTAR Lasergene Vers. 4.00, 1997 (DNASTAR Inc., USA). Sequenzen wurden in BLASTn-Datenbankrecherchen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) mit den aktuellsten Versionen der Datenbanken GenBank, EMBL, DDBJ und PDB verglichen.

2.1.11 Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA wurden von der Firma DNA-Cloning-Service (Hamburg, D) durchgeführt.

2.2 Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Bei der Verwendung von Enzymen und Kits wurde, soweit nicht anders angegeben, nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2.1 *Embryo Rescue*

Aus oberflächensterilisierten Gerstenkaryopsen wurden ca. 3-4 Wochen nach der Befruchtung die Skutella isoliert und daraus *in vitro* auf $\frac{1}{2}$ MS⁻-Medium Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen (16h Licht, 24°C) angezogen. Diese wurden anschließend in Erde und in ein Gewächshaus überführt.

2.2.2 Kreuzung von Gerste

Die Kreuzung von Gerste erfolgte nach der Methode des Pflanzenzuchtbetriebs W. von Borries-Eckendorf GmbH & Co (Hovedissen, D).

Die als Pollenakzeptor dienende Gerstenlinie wird zunächst kastriert. Eine sich dafür im richtigen Stadium befindende Ähre ist noch in der Blattspreite eingerollt, die Grannen ragen ca. 2 cm aus der Blattspreite heraus und die Stamen sind hellgrün und intakt. Die sterilen Seitenblüten der zweizeiligen Gerste werden entfernt. Von jeder Blüte der Ähre werden mit einer Pinzette die drei unreifen Staubblätter vorsichtig entfernt. Nach der Kastration einer Blüte wird die Granne $\frac{1}{2}$ bis 1 cm oberhalb der Deckspelze als Markierung abgeschnitten. Die kastrierte Ähre wird eingetütet. Am dritten Tag nach der Emaskulierung erfolgt die Pollinierung. Die Blüten des Pollendonors werden aufgeschnitten. Die Antheren müssen gelb sein und stauben. Ein halbes bis ein Staubblatt wird in die zuvor kastrierte Blüte eingeführt. Die bestäubte Ähre wird wieder eingetütet. Ca. 3-4 Wochen nach der Bestäubung kann ein *Embryo Rescue* (2.2.1) durchgeführt werden.

2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Gerste

Die Isolierung genomischer DNA aus in einer Schwingmühle (Retsch MM2000) homogenisiertem Blattmaterial erfolgte nach Dellaporta *et al.* (1983). Zusätzlich wurden die Extrakte für 30 min bei 37 °C mit 40 µg/ml RNase A verdaut, mit Isopropanol gefällt und mit 75%igem Ethanol gewaschen.

2.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gerste

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben der Gerste erfolgte nach Chomczynski *et al.* (1987). Abweichend vom Protokoll wurde nach der Extraktion mit Phenol

zweimal mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Die Fällung erfolgte mit 100%igem Ethanol. DNA-Reste wurden entweder durch eine Lithiumchlorid-Fällung oder durch Restriktion mit DNaseI (Invitrogen, Karlsruhe, D) entfernt.

2.2.5 Restriktion von DNA

Bei der Restriktion genomischer DNA für Southernblotanalysen wurden 12 µg genomische DNA mit 40 U der Restriktionsendonuklease in einem Gesamtvolumen von 45 µl über Nacht inkubiert. Restriktionspuffer und Temperatur der Inkubation wurden laut Herstellerangaben gewählt. Plasmide wurden unter Standardbedingungen restringiert.

2.2.6 Multiplex-PCR zur Genotypisierung von GT-Linien

Die DNA-Extraktion für die Multiplex-PCR aus Blättern von Keimlingen erfolgte nach Klimyuk *et al.* (1993).

Zum Nachweis des GTDsB-Konstrukts wird mit den Primern GTDs1 und GTDs2 (2.1.6) ein 456 bp-Fragment amplifiziert. Der Nachweis des Transposase-exprimierenden Konstrukts erfolgt durch Amplifikation eines 300 bp-Fragments mit den Primern cw1 und cw2 (2.1.6). In beiden Ansätzen erfolgt parallel die Amplifikation eines internen Standards. Mit den Primern Hvwaxy1 und Hvwaxy2 (2.1.6) wird ein 537 bp-Fragment aus dem *waxy*-Gen von Gerste amplifiziert.

Nachweis des GTDsB-Konstrukts mit GTDs1 und GTDs2:

Die Amplifikation erfolgt in 50 µl-Ansätzen. 1 µl Klimyuk-DNA-Extrakt, 1x PCR-Puffer mit Ammoniumsulfat, je 0,3 µM GTDs-Primer, je 1 µM *waxy*-Primer, 3 mM Magnesiumchlorid, 1 mM dNTP-Mischung (je 0,25 mM), 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase werden folgendem PCR-Profil unterzogen: 95°C 2 min// 95°C 45 sec/ 58°C 45 sec/ 72°C 50 sec, 35 Zyklen// 72°C 10 min.

Nachweis des Transposase-Konstrukts mit cw1 und cw2:

Die Amplifikation erfolgt in 50 µl-Ansätzen mit 1 µl Klimyuk-DNA-Extrakt, 1x PCR-Puffer mit Ammoniumsulfat, je 0,6 µM Primer, je 1 µM *waxy*-Primer, 3 mM Magnesiumchlorid, 1 mM dNTP-Mischung (je 0,25 mM), 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase und folgendem PCR-Profil: 95°C 2 min// 95°C 1 min/ 60°C 45 s/ 72°C 50 sec, 35 Zyklen// 72°C 10 min.

2.2.7 RT-PCR

2.2.7.1 RT-PCR verschiedener Gewebe

Die Primer GUSKL1 und GUSKL2 (2.1.6) binden in der codierenden Sequenz von *gus* und amplifizieren ein 494 bp-langes Fragment. Die Primer GAPDH_up und GAPDH_low (2.1.6) amplifizieren ein 223 bp-langes Fragment aus dem Gen für die glykolytische Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase der Gerste (*Accession number* AB120301).

Mit Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben der Gerste wird mit einem Oligo-(dT)-Primer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D) und MuMLV Reverser Transkriptase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D) nach Herstellerangaben eine cDNA-Synthese durchgeführt. Die anschließende Amplifikation erfolgt in 25 µl-Ansätzen mit 2 µl cDNA, je 0,2 µM Primer, 1x PCR-Puffer mit Ammoniumsulfat, 2 mM Magnesiumchlorid, 1,2 mM dNTP-Mischung (je 0,3 mM), 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase und folgendem PCR-Profil: 95°C 2 min// 95°C 1 min/ GAPDH 63°C, GUSKL 62°C 50 s/ 72°C 2 min, 28 Zyklen// 72°C 5 min. Abweichend dazu wurden in der unter 3.4.6 beschriebenen RT-PCR die Primer *trans2_up* und *trans2_low* statt GUSKL1 und GUSKL2 verwendet. Das Primer-*annealing* erfolgte dann bei 66°C.

2.2.7.2 RT-PCR zum Nachweis zusammengesetzter Transkripte

Mit 1 µg Gesamt-RNA aus sterilen Seitenblüten wird mit dem *gus*-spezifischen Primer R-GUS-3 (2.2.8, Abb. 5) nach Herstellerangaben eine cDNA-Synthese mit Thermoscript Reverser Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, D) durchgeführt. Zur Verifizierung der zusammengesetzten Transkripte (3.4.5) wurden die Primerpaare *trans1_up/trans1_low* und *trans2_up/trans2_low* eingesetzt. Diese binden jeweils im 5'Ende des Transkripts und im 5'Ende von *gus*. Die anschließende Amplifikation erfolgt in 25 µl-Ansätzen mit 2 µl cDNA, je 0,2 µM Primer, 1x PCR-Puffer mit Ammoniumsulfat, 2 mM Magnesiumchlorid, 1,2 mM dNTP-Mischung (je 0,3 mM), 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase und folgendem PCR-Profil: 95°C 2 min// 95°C 1 min/ *trans1_up*, *trans1_low* 64,5°C bzw. *trans2_up*, *trans2_low* 63,5°C 50 s/ 72°C 1,5 min, 30 Zyklen// 72°C 5 min.

2.2.8 5'RACE

Die 5'RACE wurde mit Modifikationen nach den Protokollen von Frohman (1993) durchgeführt.

Mit 1 µg Gesamt-RNA aus sterilen Seitenblüten wird mit einem *gus*-spezifischen Primer (GSP1, Abb. 5) nach Herstellerangaben eine cDNA-Synthese mit Thermoscript Reverser Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, D) durchgeführt. Nach Aufreinigung mit Säulen von Montage PCR (Millipore, Bedford, MA, USA) erfolgt der Abbau der RNA durch Behandlung mit Natronlauge (0,25 mM NaOH, 30 min, 37°C) oder RNase H (Invitrogen, Karlsruhe, D). Anschließend wird eine homopolymere *tailing*-Reaktion mit Terminaler Deoxynukleotidyl Transferase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D) und dATP oder dGTP nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach erneuter Aufreinigung mit Säulen dient die cDNA als Template in einer PCR mit einem Primer der an dem homopolymeren poly(dA) bzw. poly(dG) Schwanz binden kann (CB3 oder T5, Abb. 5) sowie einem zweiten, *gus*-spezifischen Primer (GSP2, Abb.5). Die Amplifikation erfolgt in 25 µl-Ansätzen mit 1-2 µl cDNA, je 0,2 µM Primer, 1x PCR-Puffer mit Ammoniumsulfat, 2 mM Magnesiumchlorid, 1,2 mM dNTP-Mischung (je 0,3 mM), 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase und folgendem PCR-Profil:

95°C 2 min// 95°C 1 min/ *annealing*-Temperatur je nach Primer (Abb.5) 50 s/ 72°C 2 min, 28 Zyklen// 72°C 5 min. Zur weiteren Amplifikation spezifischer PCR-Produkte wird eine zweite PCR mit CB3 bzw. T6 (Abb. 5) und einem geschachtelten *gus*-spezifischen Primer (GSP 3, Abb. 5) durchgeführt. 25 µl-Ansätze mit 1 µl Produkt aus der ersten PCR, je 0,2 µM Primer, 1x PCR-Puffer mit Ammoniumsulfat, 2 mM Magnesiumchlorid, 1,2 mM dNTP-Mischung (je 0,3 mM) und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase werden folgendem PCR-Profil unterzogen:

94°C 3 min// 94°C 1 min/ *annealing*-Temperatur je nach Primer (Abb. 5) 50s/ 72°C 2 min, 30 Zyklen// 72°C 10 min.

Die Produkte der zweiten PCR werden elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt und dokumentiert. Anschließend erfolgt entweder eine Southernblotanalyse (2.2.13) oder die DNA-Fragmente werden mit Säulen für die DNA-Extraktion aus Agarosegelen (Montage Gel Extraction, Millipore, Bedford, M, USA) oder Recochips (TaKaRa, Shiga, Japan) nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert und subkloniert (2.2.15).

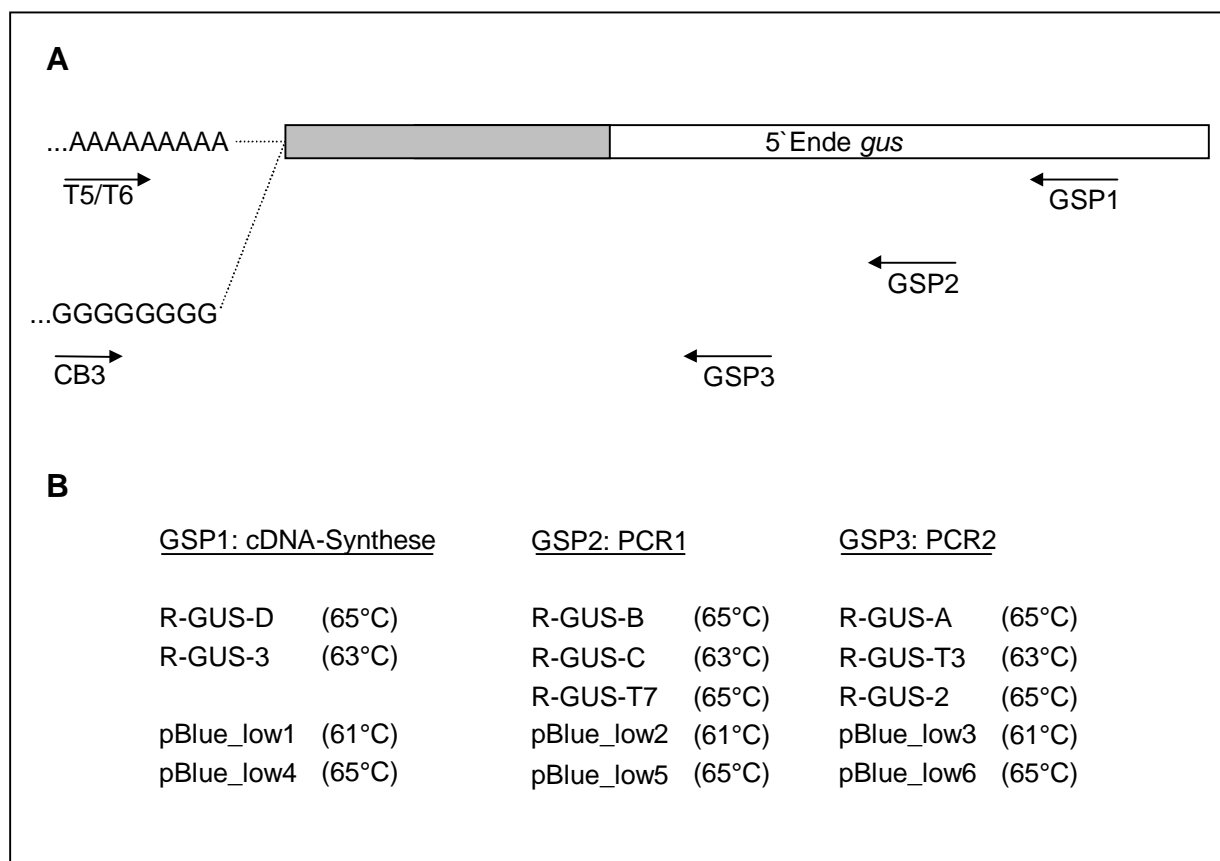


Abb. 5: Darstellung der Bindestellen und *annealing*-Temperaturen der für die 5'RACE eingesetzten Primer

A Die graue Box stellt unbekannte Sequenzen im 5'Ende eines *gus*-Fusionstranskripts dar. Der künstliche poly(dA)- bzw. poly(dG)-Tail am 5'Ende des Transkripts ist mit Buchstaben dargestellt. GSP1-3 sind *gus*-spezifische Primer. CB3 bindet am homopolymeren poly(dG)-Schwanz. T5 bindet mit einer oligo(dT)-Sequenz von 17 Nukleotiden an einem homopolymeren poly(dA)-Schwanz. T6 hat bis auf den oligo(dT)-Schwanz die gleiche Sequenz wie T5 und wird nur in der zweiten PCR eingesetzt.

B Auflistung der für cDNA-Synthese, PCR1 und PCR2 eingesetzten Primer. Die jeweilige *annealing*-Temperatur ist in Klammern angegeben. Die Sequenzen der Primer sind unter 2.1.6 angegeben.

2.2.9 Kolonie-PCR

Die Amplifikation erfolgt in 25 µl-Ansätzen mit 1-2 µl cDNA, je 0,2 µM Primer T6 und R-GUS-T3, 1x PCR-Puffer mit Ammoniumsulfat, 2 mM Magnesiumchlorid, 1,2 mM dNTP-Mischung (je 0,3 mM), 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase und folgendem PCR-Profil: 95°C 2 min// 95°C 1 min/ 62°C 50 s/ 72°C 2 min, 28 Zyklen// 72°C. Die Bakterien werden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte in die Reaktionslösung überführt.

2.2.10 Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden

Die Herstellung der *gus*-spezifischen, Digoxigenin-markierten Sonde GUS1/2 (2.1.7) wird in einer PCR mit den Primern GUS1 und GUS2 (2.1.6) durchgeführt. Als Matrize werden 4 ng pGTDsB (2.1.5) eingesetzt. In den 100 µl-Markierungsansatz werden 1x PCR-Puffer, dNTP-Mischung (dATP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, dCTP 0,2 mM, dTTP 0,13 mM), 3,5 µl DIG-dUTP, Primer GUS1 und GUS2 (je 0,25 µM), Magnesiumchlorid (1,5 mM) und *Taq*-DNA-Polymerase (5 U) eingesetzt. Die DIG-Markierung erfolgt bei folgendem PCR-Profil: 96°C 3 min// 96°C 1 min/ 56°C 1 min/ 72°C 2 min, 30 Zyklen// 72°C 5 min.

Die Herstellung der Transposase-spezifischen, Digoxigenin-markierten Sonde Ac5/6 (2.1.7) wird in einer PCR mit den Primern Ac5 und Ac6 (2.1.6) durchgeführt. Als Matrize werden 4 ng pAH2-Vektor (2.1.5) eingesetzt. In den 100 µl-Markierungsansatz werden 1x PCR-Puffer, dNTP-Mischung (dATP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, dCTP 0,2 mM, dTTP 0,13 mM), 3,5 µl DIG-dUTP, Primer Ac5 und Ac6 (je 0,25 µM), Magnesiumchlorid (1,5 mM) und *Taq*-DNA-Polymerase (5 U) eingesetzt. Die Markierung erfolgt bei folgendem PCR-Profil: 96°C 3 min// 96°C 1 min/ 56°C 1 min/ 72°C 2 min, 30 Zyklen// 72°C 5 min.

2.2.11 Herstellung eines Digoxigenin-markierten *gus-antisense*-Transkripts

Mit 2 µg GUS-AB-M Vektor (2.1.5), mit *Hind*III linearisiert, wurde zur Digoxigenin-Markierung eines *gus-antisense* Transkripts eine *in vitro*-Transkription mit T3-RNA-Polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, D) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.12 Southernblotanalyse von genomischer DNA

Restringierte, genomische DNA wird in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Behandlung der Gele 10 min in 0,2 N HCl, 30 min in Denaturierungspuffer und zweimal 20 min in Neutralisierungspuffer erfolgt die Übertragung der DNA durch Kapillartransfer (Southern 1975) mit 20x SSC als Transferflüssigkeit auf eine Nylonmembran (Hybond[®]NX, Amersham, Freiburg, D). Die DNA wird in einem UV-Crosslinker (Stratalinker[™] Stratagene, Heidelberg, D) mit 1200 µJ auf der Membran fixiert. Der Nachweis der DNA erfolgt mit den DIG-markierten DNA-Sonden GUS1/2 oder Ac5/6 (2.1.7)

in einer Konzentration von 20-25 ng/ml Hybridisierungslösung mit Formamid nach Becker *et al.* (1994). Die chemilumineszente Detektion der DIG-markierten DNA wird mit anti-DIG-Antikörpern mit Alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, D) und CSPD (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, D) durchgeführt. Die Detektion erfolgt nach den Angaben im Handbuch für das DIG-System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, D 1995). Die Membranen werden zur Dokumentation auf Hyperfilm™ (Amersham, Freiburg, D) exponiert.

2.2.13 Southernblotanalyse von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte werden in 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Nach Behandlung der Gele 30 min in Denaturierungspuffer und zweimal 20 min in Neutralisierungspuffer erfolgt die Übertragung der DNA durch Kapillartransfer (Southern 1975) mit 20x SSC als Transferflüssigkeit auf eine Nylonmembran (Hybond®NX, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D). Die Fixierung der DNA erfolgt mit 1200 µJ in einem UV-Crosslinker (Stratalinker™ Stratagene, Heidelberg, D). Der Nachweis der DNA erfolgt nach Becker *et al.* (1994) mit den Sonden GUS1/2 oder 35bp-GUS-Oligo (2.1.7). Das Protokoll für den DIG-Nachweis wird bei der Verwendung der 5'DIG-markierten Oligo-Sonde (35bp-GUS-Oligo, 2.1.7) modifiziert. Die Hybridisierung erfolgt mit 1,5 pmol Oligo-Sonde/ml Hybridisierungslösung ohne Formamid bei 62°C. Das Waschen der Membranen nach der Hybridisierung wird wie folgt durchgeführt: 1x 5 min W1 Raumtemperatur, 1x 5 min W1 62°, 2x 15 min W2 62°C. Die Detektion DIG-markierter DNA-Fragmente mit anti-DIG-Antikörpern mit Alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, D) und CSPD (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, D) erfolgt nach den Angaben im Handbuch für das DIG-System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim 1995). Die Membranen werden zur Dokumentation auf Hyperfilm™ (Amersham, Freiburg, D) exponiert.

2.2.14 Northernblotanalyse

Gesamt-RNA wird auf einem 1%igen (w/v) denaturierenden Agarosegel (6% Formaldehyd (v/v)) aufgetrennt. Der Transfer der RNA auf Hybond NX-Nylonmembran (Amersham, Freiburg, D) erfolgt per Kapillartransfer mit 20x SSC als Transferflüssigkeit. Die Hybridisierung des Northernblot-Filters erfolgt mit 100 ng/ml Hybridisierungslösung [5x SSC, 0,1% N-Laurylsarcosin, 50% Formamid, 0,2% SDS, 10 mg/ml Heringssperma und 0,02 g/ml Blocking-Reagenz (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, D)] eines Digoxigenin-markierten *gus-antisense*-Transkripts (2.2.11) bei 68 °C. Die Membran wird zweimal 15 min bei Raumtemperatur mit 2x SSC, 0,1% SDS, zweimal 15 min bei 68 °C mit 0,5x SSC, 0,1% SDS und zweimal 15 min bei 68 °C mit 0,1x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Die Detektion erfolgt nach den Angaben im Handbuch für das DIG-System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim 1995). Die Membranen werden zur Dokumentation auf Hyperfilm™ (Amersham, Freiburg, D) exponiert.

2.2.15 Subklonierung von PCR-Fragmenten

Die Subklonierung von PCR-Fragmenten wurde mit dem TOPO[®] TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe, D) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Abweichend dazu wurden 5 µl PCR-Produkt in die Klonierungsreaktion mit dem pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor gegeben und 3 µl dieser Reaktion in die anschließende Transformation der kompetenten TOP10F[']-*E. coli*-Zellen eingesetzt. Die Identifizierung positiver Kolonien erfolgte durch eine Blau/Weiß-Selektion. Einzelne weiße Kolonien der transformierten Bakterien wurden in 5 ml DYT-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37°C und 250 rpm kultiviert.

2.2.16 Histochemischer GUS-Assay

Die durch das *gus*-Reportergen des GTDsB-Konstrukts vermittelte Aktivität der β-Glukuronidase wurde mittels eines histochemischen GUS-Tests nachgewiesen. Die für histochemische GUS-Assays der GT-F2-Population ausgewählten Organe und Entwicklungsstadien sind in Abb. 11 (3.3.1) dargestellt. Die Organe wurden nach standardisierten Arbeitsschritten auf die histochemische GUS-Färbung vorbereitet (Tab. 2). Für die Durchmusterung der Organe nach der GUS-Färbung wurden diese in festgelegten Arbeitsschritten präpariert (Tab. 2, Auswertung) und unter einem Binokular betrachtet.

Tab. 2: Präparation der Organe für die GUS-Färbung und Auswertung

Organ	Vorbereitung	Auswertung
Blüten	Abzupfen von der Ähre, Abschneiden der oberen Blütenspitze mit Granne	Öffnen der Blüte durch Abziehen von Deck- und Vorspelze, Entnahme der inneren Blütenorgane
Nodium	Halbieren	Zerschneiden
Blatt	in Stücke schneiden	-
Korn	Entspelzen, halbieren	Herauslösen des Endosperms
Keimling	Zerschneiden, wenn größer als 1 cm	Zerschneiden

Die histochemische GUS-Färbung erfolgte nach modifizierten Protokollen von Jefferson *et al.* (1987) und Dai *et al.* (1996). Die Blüten, Nodien und Blätter wurden 1 Stunde in 90% Aceton bei -20°C und die entspelzten Körner 5 min in 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur vorbehandelt und anschließend zweimal mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen.

Die Explantate wurden in einem Färbepuffer [50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,0), 10 mM EDTA (pH 7,0), 0,5% Triton X-100], welcher in einer Konzentration von 1,5 mM das Substrat X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Glukuronsäure) enthält, nach zweiminütiger Vakuum-Infiltration bei 12,3 psi in der *particle gun* (Bio-Rad, München, D) für 24 h bei 37°C inkubiert. Grüne Gewebe wurden mit 96%igem Ethanol entfärbt. Die Proben wurden in 75%igem Ethanol bei 4°C gelagert.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung von *gene trap*(GT)-Linien für die funktionelle Genomanalyse von Gerste. Dabei wurde erstmalig das für monokotyle Pflanzen optimierte *gene trap*-Konstrukt GTDsB (Bergmann und Lütticke 2004) eingesetzt. Für die Überprüfung des Konzepts wurden zwei Fragen vorrangig bearbeitet:

1. Transponiert das *gene trap*-Konstrukt GTDsB in den GT-Linien?
2. Kann eine Expression des *gus*-Reportergens detektiert werden?

Erkenntnisse aus der Bearbeitung dieser Fragestellungen geben Hinweise darauf, ob und mit welchem Potential das etablierte System zur funktionellen Genomanalyse von Gerste eingesetzt werden kann.

3.1 Etablierung der *gene trap*-Population

Für Untersuchungen zum Transpositionsverhalten des GTDsB-Konstrukts muss die Transposase (TPase) in den genetischen Hintergrund von GTDsB eingebracht werden, da in diesem Ansatz mit einem Zweikomponenten-System gearbeitet wird (Abb. 4). Es wurden zunächst geeignete GTDsB-Linien ausgewählt. Diese wurden mit Gerstenlinien, die ein Transposase-exprimierendes Konstrukt tragen, gekreuzt. Das Ziel dabei war die Herstellung einer großen Zahl an unabhängigen GT-Linien. In diesen GT-Linien wurde die Transposition des GTDsB-Konstrukts analysiert.

3.1.1 Auswahl und Charakterisierung von GTDsB-Linien

Für diese Arbeit standen 34 unabhängige GTDsB-T0-Linien zur Verfügung (2.1.8.1). In Southernblotanalysen war in allen Linien mindestens eine Integration eines vollständigen GTDsB-Konstrukts nachgewiesen worden. Darüber hinaus indizieren die Southernblotanalysen, dass in einigen Linien mehrere Integrationsloci von GTDsB sowie rearrangierte GTDsB-Konstrukte vorliegen (Lütticke, persönliche Mitteilung). Es wurde entschieden, eine möglichst große Zahl an unabhängigen GTDsB-Parentallinien mit einer heterogenen Zahl an GTDsB-Integrationsloci einzusetzen. Die Anzahl der GTDsB-Linien, die in das Programm aufgenommen werden konnten, reduzierte sich aufgrund von Problemen bei der Keimung des zur Verfügung gestellten T1-Saatguts. Es wurden schließlich 14 GTDsB-Linien ausgewählt (Tab. 3). 120 Nachkommen von diesen Linien wurden mit einer Multiplex-PCR (2.2.6) zum Nachweis des GTDsB-Konstrukts genotypisiert. So konnten 84 GTDsB-positive Nachkommen identifiziert werden. Diese wurden in Southernblotanalysen näher charakterisiert.

In den Nachkommen der 14 GTDsB-T0-Linien wurde die Anzahl der Integrationsloci des GTDsB-Konstrukts bestimmt. Die genomische DNA der 84 GTDsB-T1-Pflanzen wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Mun*I geschnitten. Beide Enzyme schneiden jeweils nur einmal im GTDsB-Konstrukt, *Bam*HI im 3' und *Mun*I im 5'Ende. Die dabei entstehenden

Restriktionsfragmente liefern nach der Detektion mit einer *gus*-spezifischen Sonde (2.1.7) in einer Southernblotanalyse (2.2.12) einen Hinweis auf die Anzahl an Integrationsloci des GTDsB-Konstrukts im Gerstengenom. In Abb. 6 ist exemplarisch die Southernblotanalyse von 19 Nachkommen der Linie GTDsB 14 nach Restriktion der genomischen DNA mit *Bam*HI gezeigt. Die vollständige Auswertung der Southernblotanalysen der GTDsB-T1-Generation ist in Tab. 3 zusammengefasst.

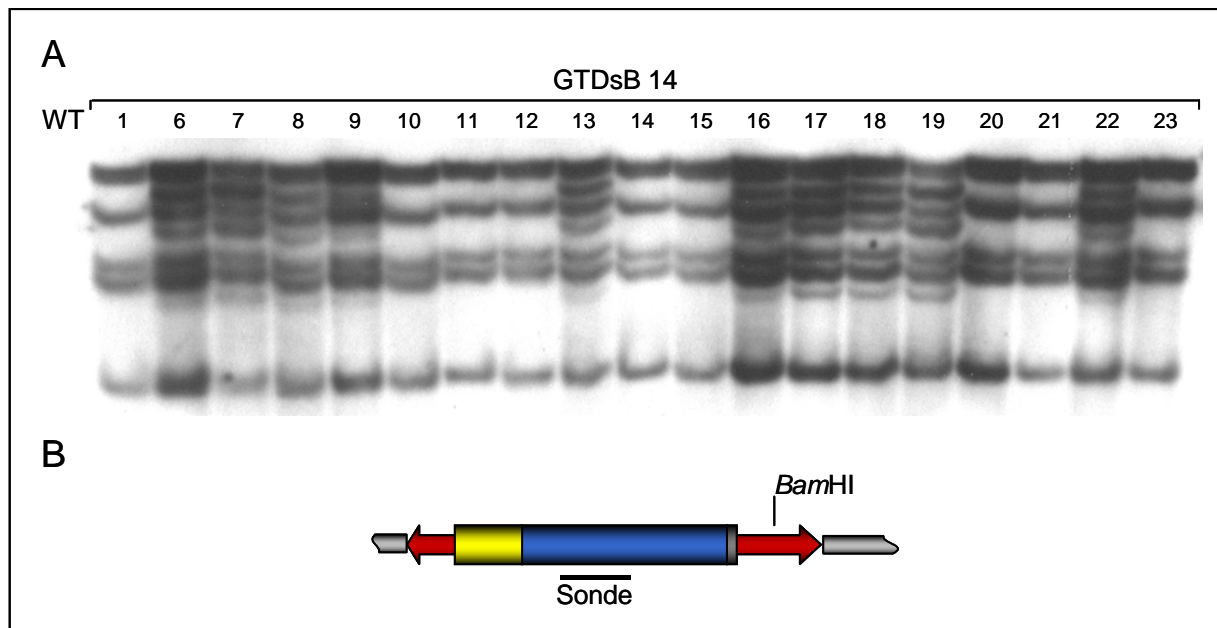


Abb. 6: Southernblotanalyse zum Nachweis von GTDsB-Integrationsloci in Nachkommen der Linie GTDsB 14

A Genomische DNA von 19 Nachkommen der T0-Linie GTDsB 14 sowie des Wildtyps Golden Promise (WT) wurde mit *Bam*HI restringiert. Die nicht fortlaufende Nummerierung dieser Proben ergibt sich aus der Identifizierung GTDsB-negativer Nachkommen. Die Detektion in der Southernblotanalyse erfolgte mit der *gus*-spezifischen Sonde GUS1/2 (2.1.7). **B** Schematische Darstellung der Restriktionsschnittstelle von *Bam*HI im GTDsB-Konstrukt. Das GTDsB-Konstrukt ist farbig dargestellt, angrenzende Sequenzen grau. Die Bindestelle der *gus*-spezifischen Sonde ist markiert.

Von den 19 untersuchten Nachkommen der Linie GTDsB 14 zeigen neun, GTDsB 14/1, GTDsB 14/10, GTDsB 14/11, GTDsB 14/12, GTDsB 14/14, GTDsB 14/15, GTDsB 14/20, GTDsB 14/21 und GTDsB 14/23, fünf spezifische Hybridisierungssignale (Abb. 6 A). In zehn Nachkommen, GTDsB 14/6, GTDsB 14/7, GTDsB 14/8, GTDsB 14/9, GTDsB 14/13, GTDsB 14/16, GTDsB 14/17, GTDsB 14/18, GTDsB 14/19 und GTDsB 14/22 konnten acht Hybridisierungssignale detektiert werden. Das deutet auf eine unabhängige Vererbung einzelner GTDsB-Integrationsloci hin. Die Southernblotanalysen haben gezeigt, dass außer in den Nachkommen der Linie GTDsB 14 auch in Nachkommen der Linien GTDsB 31 und GTDsB 5 eine Segregation von GTDsB-Integrationsloci stattfindet (Tab. 3). Die Nachkommen einer GTDsB-Linie mit unterschiedlichen GTDsB-Hybridisierungssignalen wurden als unabhängige Linien betrachtet und mit Buchstaben (A, B, C) benannt. Folglich besteht die GTDsB-T1-Generation aus 18 unabhängigen GTDsB-Linien (Tab. 3).

Tab. 3: Anzahl der GTDsB-Integrationsloci in den GTDsB-T1-Pflanzen

GTDsB-Linie	Anzahl der analysierten T1-Pflanzen	Anzahl der GTDsB-Integrationsloci (<i>Bam</i> HI)	Anzahl der GTDsB-Integrationsloci (<i>Mun</i> I)	Anzahl der Restriktionsfragmente (<i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI)
2a	7	2	1	1
2d	1	2	1	1
23	6	1	2	1-2
31B ^a	10	2	2	2
31C ^{a/b}	4	2	2	3
6a, 6c	2	2	4	3
31A ^a	15	4	4	5
9 ^b	1	4	4	5
16	3	3	5	6
30	1	4	5	3
5B ^a	1	3	7	4
14A ^a	9	5	6	6
11	1	8	5	5
10	1	6	7	9
5A ^a	3	6	8	5
24	7	7	8	9
14B ^a	10	8	10	12
26	2	12	12	12
Summe: 18	Summe: 84			

^a Segregation der GTDsB-Integrationsloci in Nachkommen der T0-Linien GTDsB 31, GTDsB 5 und GTDsB 15.

^b Ein GTDsB-Konstrukt vollständiger Länge konnte nicht nachgewiesen werden.

Die untersuchten GTDsB-T1-Linien enthalten von 1-2 bis zu 12 Integrationsloci des GTDsB-Konstrukts. Für 13 der 18 Linien ergab sich aus den Southernblotanalysen mit den beiden Enzymen *Bam*HI und *Mun*I eine unterschiedliche Anzahl an GTDsB-Integrationsloci. Das ist ein Hinweis auf Rearrangements von GTDsB-Konstrukten.

Die Linien GTDsB 6a und 6c zeigten in den Southernblotanalysen die gleichen GTDsB-Hybridisierungssignale und wurden daher bei der Durchführung der Experimente als klonal betrachtet. In einigen Nachkommen der Linie GTDsB 6a konnte allerdings ein vom Wildtyp abweichender Phänotyp beobachtet werden, der in den Nachkommen der Linie GTDsB 6c nicht auftritt (Lütticke, persönliche Mitteilung). In den Nachkommen der Linien GTDsB 2a und GTDsB 2d wurden in den Southernblotanalysen ebenfalls gleiche Hybridisierungssignale detektiert. Das ist ein Hinweis darauf, dass es sich um klonale Linien handelt.

Das Vorhandensein vollständiger GTDsB-Konstrukte in der T1-Generation wurde in einer Southernblotanalyse von einem Repräsentanten jeder der 18 GTDsB-Linien überprüft. Die Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Hind*III schneiden ein 3537 bp-langes Fragment aus dem Transformationsvektor aus, in welchem das 3465 bp-lange GTDsB-Konstrukt vollständig enthalten ist (Abb. 7 B).

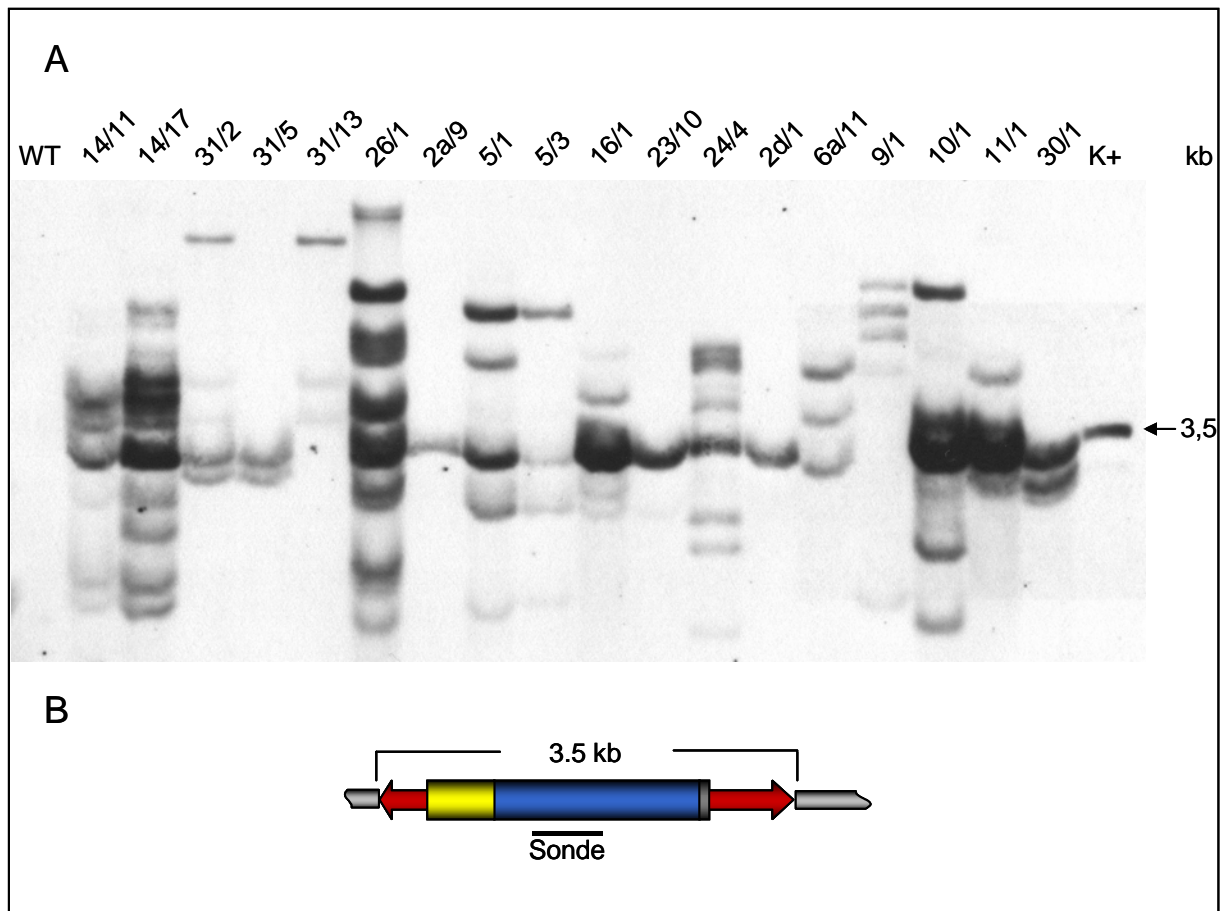


Abb. 7: Southernblotanalyse zum Nachweis vollständiger GTDsB-Konstrukte

A Genomische DNA der angegebenen Nachkommen von 18 GTDsB-T0-Linien, genomische DNA des Wildtyps Golden Promise (WT) und der Transformationsvektor pGTDsB (K+, 2.1.5) wurden mit *EcoRI* und *HindIII* restringiert. Die Detektion erfolgte mit der *gus*-spezifischen Sonde GUS1/2 (2.1.7). **B** Schematische Darstellung der Restriktionsschnittstellen von *EcoRI* und *HindIII* im GTDsB-Konstrukt. Das GTDsB-Konstrukt ist farbig dargestellt, angrenzende Sequenzen grau. Das ausgeschnittene Fragment hat eine Größe von 3,5 kb. Die Bindestelle der *gus*-spezifischen Sonde ist markiert.

In den Nachkommen aller GTDsB-Linien, mit Ausnahme von GTDsB 9 (Abb. 7 A, 9/1), sowie der Segregationslinie 31C (Abb. 7 A, 31/13) konnte das vollständige GTDsB-Konstrukt von 3,5 kb nachgewiesen werden. Die Linien GTDsB 9 und GTDsB 31C wurden daher nicht für Kreuzungen eingesetzt. In den Nachkommen der Linien GTDsB 2a und GTDsB 2d konnten in den Southernblotanalysen mit *BamHI* zwei Integrationsloci und mit *MunI* ein Integrationslocus des GTDsB-Konstrukts detektiert werden (Tab. 3). Die Southernblotanalyse mit *EcoRI* und *HindIII* weist darauf hin, dass in diesen Linien ausschließlich ein GTDsB-Konstrukt vollständiger Größe enthalten ist (Abb. 7 A, 2a/9 und 2d/1). In den restlichen GTDsB-Linien konnte neben dem Restriktionsfragment von 3,5 kb, welches das vollständige GTDsB-Konstrukt repräsentiert, zusätzlich eine variable Anzahl (1-11) kleinerer oder größerer Restriktionsfragmente detektiert werden (Abb. 7, Tab. 3). Dies ist ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein von rearrangierten GTDsB-Konstrukten in der Mehrzahl der GTDsB-T1-Linien.

Schließlich standen insgesamt 79 Nachkommen von 16 GTDsB-T0-Linien mit mindestens einer vollständigen Kopie des GTDsB-Konstrukts für Kreuzungen mit den TPase-Linien zur

Verfügung. In diesen ist die Anzahl an GTDsB-Integrationsloci sehr heterogen. Es sind Linien mit einer geringen (ein bis zwei), einer mittleren (zwei bis sieben) und einer hohen (fünf bis zwölf) Anzahl an Integrationsloci des GTDsB-Konstrukts vertreten (Tab. 3).

3.1.2 Kreuzung von Transposase- und GTDsB-Linien

Die Herstellung von GT-Linien erfolgt durch Kreuzung von Transposase(TPase)-exprimierenden Gerstenlinien mit Linien, die das *gene trap*-Konstrukt GTDsB enthalten. Für den Aufbau der GT-Population standen vier unabhängige TPase-Linien zur Verfügung. Diese enthalten zwei verschiedene TPase-Konstrukte sowie eine unterschiedliche Anzahl an TPase-tragenden Genloci (2.1.8.1). Die Kreuzung der vier TPase-Linien mit jeder der 16 GTDsB-Linien ergibt 64 mögliche Kombinationen. Das Kreuzen des Selbstbestäubers Gerste ist unter 2.2.2 beschrieben. Für die praktische Durchführung der Kreuzungen war es wichtig, dass die Transposase-Linien über den gesamten Zeitraum als Pollendonator bzw. Pollenakzeptor zur Verfügung standen, in dem die GTDsB-Linien gekreuzt werden können. Mit *Embryo Rescue* (2.2.1) wurden daher von den vier TPase-Linien sukzessive jeweils mindestens 30 Nachkommen hergestellt (2.1.8.1).

Insgesamt wurden ca. 6000 Blüten emaskuliert und polliniert. Die Ausbeute waren 1442 Körner der F1-Generation. Aus den Kreuzungen mit den Linien GTDsB 5, GTDsB 24 und GTDsB 30 sowie den Kombinationen GTDsB 2d x cw34 und GTDsB 11 x DHcw21 sind keine Nachkommen entstanden (Tab. 4). Insgesamt konnten für 46 der 64 möglichen Kreuzungskombinationen Nachkommen produziert werden.

3.1.3 F1- und F2-Generation der *gene trap*-Population

Aus den Kreuzungen von GTDsB- und Transposase-Linien sind Nachkommen entstanden, in denen beide Konstrukte vorliegen und somit eine Transposition von GTDsB stattfinden kann (Abb. 4). Diese Nachkommen, die so genannten GT-Linien, bilden die Basis der *gene trap*-Population mit der Analysen zur Transposition von GTDsB und Expression des Reportergens durchgeführt wurden.

Zwei der für die Kreuzungen verwendeten TPase-Linien (2.1.8.1), DHcw21 und DHcw42, sind doppelthaploid und somit homozygot für die TPase-Konstrukte. Die beiden restlichen TPase-Linien cw34 und cw74 sind im Hinblick auf die TPase-Konstrukte hemizygot. Die GTDsB-Linien wurden bezüglich eines hemi- oder heterozygoten Status der GTDsB-Integrationsloci nicht näher charakterisiert. Es wurde daher erwartet, dass die TPase- und GTDsB-Loci nicht an alle Nachkommen der Kreuzungen vererbt werden. Daher wurden 203 F1-Keimlinge von 46 erfolgreichen Kreuzungskombinationen mit einer Multiplex-PCR (2.2.6) genotypisiert. Es konnten 79 Pflanzen identifiziert werden, die sowohl GTDsB- als auch TPase-Konstrukte enthalten (Tab. 4). In dieser GT-F1-Population sind die Nachkommen von 29 Kreuzungskombinationen repräsentiert. Aus den Kreuzungen von 15 GTDsB-Linien mit der Linie cw3 konnten insgesamt nur drei TPase-positive Nachkommen identifiziert werden (Tab. 4).

Wie bereits erwähnt, waren zwei der vier TPase-Linien (2.1.8.1), cw34 und cw74, in Bezug auf die Transposase-Integrationsloci hemizygot. In Southernblotanalysen von Nachkommen aus Selbstungen dieser Linien konnte in der Linie cw74 eine Segregation der vier TPase-Integrationsloci beobachtet werden (Friedrich, persönliche Mitteilung). Um die Segregation der TPase-Loci in den Nachkommen aus Kreuzungen mit der TPase-Linie cw74 zu evaluieren, wurde die genomische DNA der 35 GT-F1-Pflanzen mit *Bam*HI restringiert und in einer Southernblotanalyse (2.2.12) mit einer für das TPase-Konstrukt spezifischen Sonde (2.1.7) hybridisiert. Von den insgesamt 35 Nachkommen aus Kreuzungen mit der TPase-Linie cw74 (Tab. 4) enthalten zwei Nachkommen nur noch einen Integrationslocus und sieben Nachkommen drei der ursprünglich vier Integrationsloci des TPase-Konstrukts (Daten nicht gezeigt). Diese wurden nicht in die GT-F2-Generation überführt.

Tab. 4: F1-Generation der GT-Population

TPase GTDsB	DHcw21	cw34	DHcw42	cw74	Summe der F1- Pflanzen pro GTDsB-Linie
2a	3	-	6	1	10
2d	-	-	3	-	3
23	4	2	1	4	11
31B	-	-	4	5	9
6c, 6a	1	-	1	2	4
31A	2	-	-	7	9
16	2	-	-	4	6
30	-	-	-	-	-
5B	-	-	-	-	-
14A	-	-	2	3	5
11	-	1	1	2	4
10	4	-	3	2	9
5A	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-
14B	2	-	-	3	5
26	2	-	-	2	4
Summe	20	3	21	35	79

Insgesamt besteht die GT-F1-Generation aus 79 unabhängigen GT-Linien. Diese repräsentieren 12 der 16 GTDsB-Parentallinien und 29 der 64 theoretisch möglichen Kreuzungskombinationen. Die einzelnen GT-F1-Linien wurden mit dem Kürzel GT (*gene trap*) und einer individuellen Nummer benannt.

Erste Untersuchungen zur Expression des *gus*-Reportergens sind mit den Pflanzen der GT-F2-Population sinnvoll. In diesen können, neben Ereignissen der GT-F2-Generation, solche detektiert werden, die auf einer vererbten Transposition des GTDsB-Konstrukts in der F1-Generation beruhen. Das erhöht die Wahrscheinlichkeit, eine Expression des Reportergens zu finden. Die Größe der Population ist ein Faktor, der die Aussagekraft der Experimente bestimmt. Daher wurde ein Kompromiss zwischen einer möglichst großen Population und der praktischen Machbarkeit geschlossen und die Populationsgröße auf ca. 200 Pflanzen begrenzt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass in der GT-F2-Population Nachkommen aus

Kreuzungen von jeder der 12 GTDsB-Parentallinien mit mindestens zwei unabhängigen TPase-Kreuzungspartnern repräsentiert sind. Als Vertreter der wahrscheinlich klonalen Linien GTDsB 2a und 2b (3.1.1) wurden nur noch die Nachkommen der Linie GTDsB 2a in die F2-Population überführt.

Für den Aufbau der GT-F2-Population wurde *Embryo Rescue* (2.2.1) von 349 Körnern von insgesamt 28 der 79 GT-F1-Linien durchgeführt (Abb. 8). Pro GT-F1-Linie wurden durchschnittlich von 12 Körnern Embryonen isoliert und Keimlinge kultiviert. Der Nachweis der GTDsB- und Transposase-Konstrukte in allen Keimlingen der GT-F2-Generation erfolgte mit einer Multiplex-PCR (2.2.6). So konnten 191 Pflanzen identifiziert werden, in denen sowohl GTDsB- als auch TPase-Konstrukte vorhanden sind. In der GT-F2-Population sind 11 der ursprünglich 16 in die Kreuzungen einbezogenen GTDsB-Parentallinien vertreten (Abb. 8). Eine Übersicht über die in der GT-F2-Population vertretenen Linien bietet Tab. 6 im Abschnitt 3.2.2. Einen Überblick zur Etablierung der GT-F1- und GT-F2-Population bietet das Schema in Abb. 8.

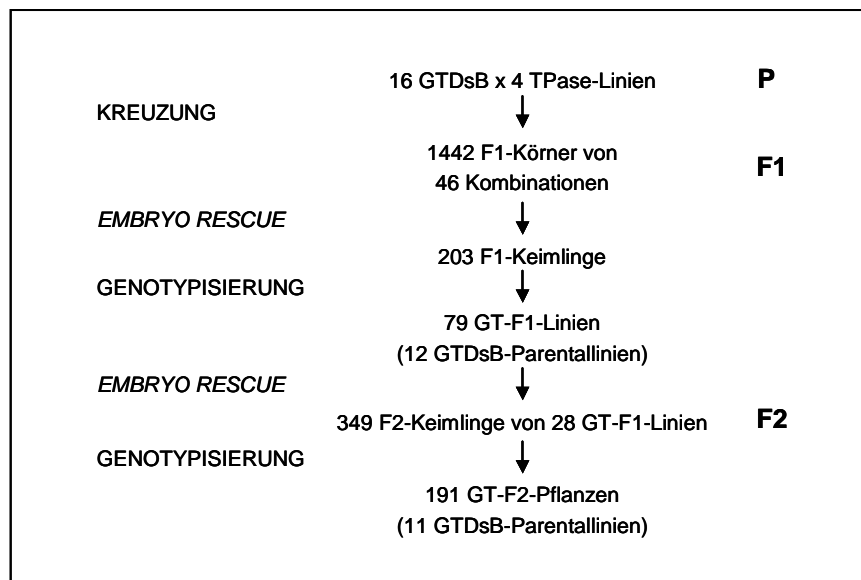


Abb. 8: Schema zum Aufbau der F1- und F2-Generation der GT-Population
 Schematische Zusammenfassung der Etablierung der GT-F1- und GT-F2- Population.
 Links angegeben sind die einzelnen Arbeitsschritte, rechts die jeweilige Generation.

3.2 Transposition von GTDsB

Ziel der Kreuzungen war die Einführung der Transposase in die GTDsB-Linien, um eine Transaktivierung der GTDsB-Konstrukte zu ermöglichen. Ob eine Transposition von GTDsB-Konstrukten stattgefunden hat, kann in Southernblotanalysen untersucht werden. Für diese Untersuchungen werden Restriktionsenzyme verwendet, die nur einmal im GTDsB-Konstrukt schneiden. Der Nachweis spezifischer Restriktionsfragmente erfolgt mit einer Sonde, die im *gus*-Reportergen des GTDsB-Konstrukts bindet. Eine Veränderung der genomischen Position eines GTDsB-Konstrukts in einer GT-Linie kann durch den Vergleich mit den Hybridisierungssignalen der entsprechenden GTDsB-Parentallinie erkannt werden. In diesen Analysen werden Hybridisierungssignale mit im Vergleich zur Parentallinie

veränderter Größe oder zusätzliche Hybridisierungssignale als Hinweis auf eine Transposition von GTDsB gewertet. Bei den so detektierten Transpositionen, kann es sich um Ereignisse in somatischem Gewebe der Pflanzen handeln. Ob die transponierten GTDsB-Konstrukte an die nächste Generation vererbt werden, kann in Analysen der Nachkommen untersucht werden. Die 79 Pflanzen der GT-F1-Population und die 191 Pflanzen der GT-F2-Population wurden in Southernblotanalysen untersucht, mit dem Ziel Informationen darüber zu erhalten, ob überhaupt und mit welcher Frequenz das GTDsB-Konstrukt transponiert.

3.2.1 Transposition von GTDsB in der GT-F1-Population

Die 79 Pflanzen der GT-F1-Population wurden in einer Southernblotanalyse (2.2.12) auf Transpositionen von GTDsB untersucht. Das verwendete Restriktionsenzym *Bam*HI schneidet nur einmal im 3'Ende des GTDsB-Konstrukts (Abb. 6 B). Aus dem Vergleich der Hybridisierungssignale mit denen der jeweiligen GTDsB-Parentallinien ergaben sich in elf GT-F1-Pflanzen Hinweise auf Transpositionen des GTDsB-Konstrukts (Daten nicht gezeigt). Da die Ergebnisse nicht in allen Linien eindeutig waren, wurden die elf Kandidaten in weiteren Southernblotanalysen genauer analysiert. Die Restriktion erfolgte dabei einmal mit dem Enzym *Bg*III und zusätzlich mit *Bcu*I. Beide Enzyme schneiden ebenfalls jeweils nur einmal im GTDsB-Konstrukt (Abb. 9 B).

Aus den Southernblotanalysen mit *Bam*HI, *Bg*III und *Bcu*I ergaben sich für neun Linien der GT-F1-Population eindeutige Hinweise auf Transposition des GTDsB-Konstrukts (Tab. 5).

Tab. 5: GT-F1-Linien mit Transposition des GTDsB-Konstrukts

GTDsB-Parentallinie	TPase-Linie	GT-F1-Linie mit Transposition
GTDsB 23	cw34	GT29
	cw74	GT41
	cw74	GT44
	cw74	GT45
GTDsB 31B	cw74	GT64
	cw74	GT68
GTDsB 31A	cw74	GT62
GTDsB 11	cw34	GT82
GTDsB 14B	DHcw42	GT14

Es handelt sich dabei um Nachkommen von fünf verschiedenen GTDsB-Parentallinien, die mit cw34 oder cw74 gekreuzt wurden. In den Linien GT14, GT41, GT44, GT45, GT62, GT64, GT68 und GT82 konnten in den Southernblotanalysen mit *Bg*III bzw. *Bcu*I Hybridisierungssignale detektiert werden, die nicht in der jeweils zugehörigen GTDsB-Parentallinie vorhanden sind (Abb. 9 A). In der Linie GT29 treten ebenfalls im Vergleich zur Parentallinie GTDsB 23 veränderte Hybridisierungssignale auf. Dieses war allerdings nur in der Southernblotanalyse mit *Bam*HI sichtbar. Damit konnten in insgesamt neun der 79 untersuchten GT-F1-Pflanzen Hinweise auf Transposition des GTDsB-Konstrukts detektiert werden.

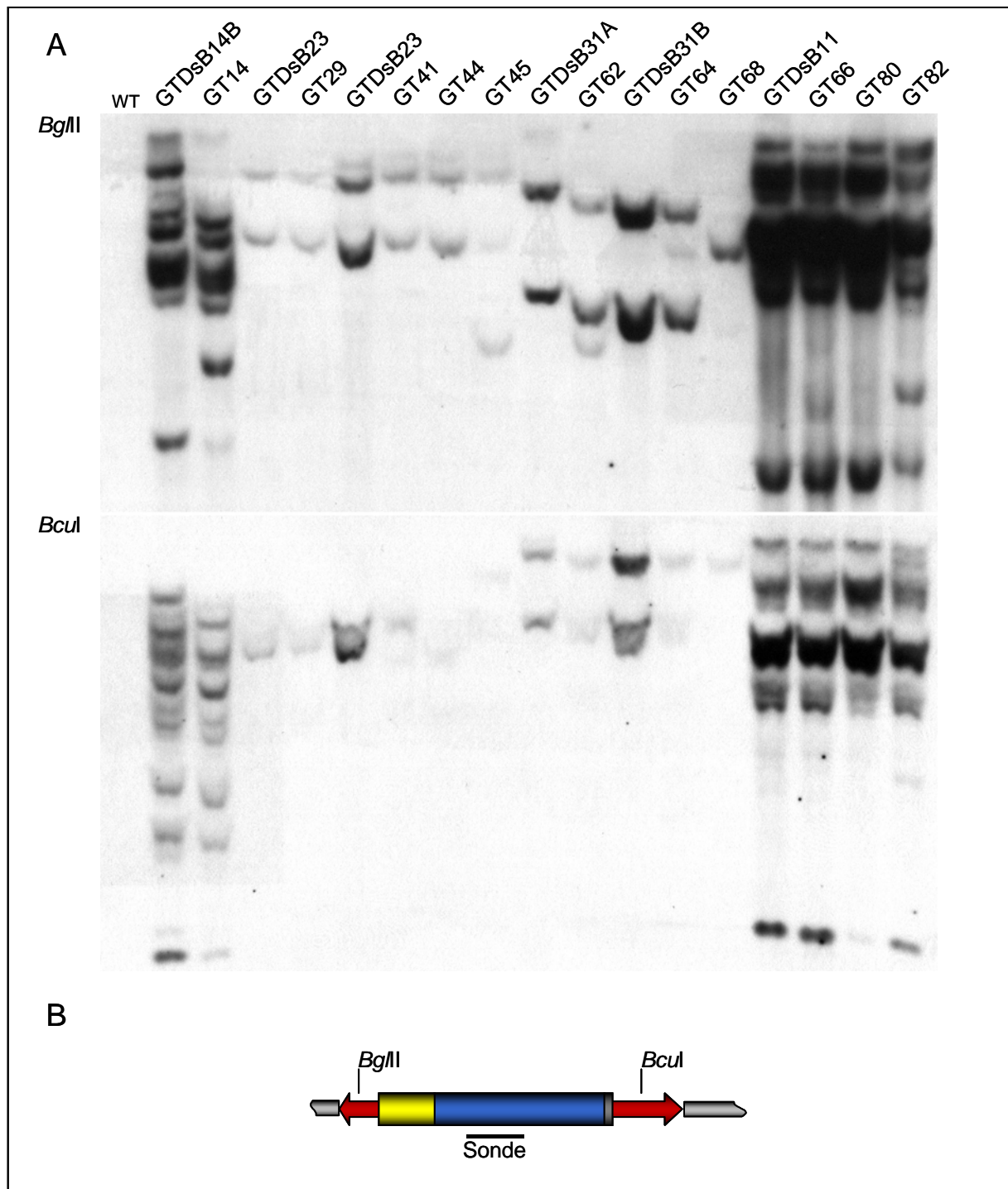


Abb. 9: Southernblotanalyse zum Nachweis von Transposition des GTDsB-Konstrukts

A Genomische DNA der angegebenen GTDsB-Parentallinien (GTDsB) sowie deren Nachkommen aus Kreuzungen mit TPase-Linien (GT) und genomische DNA von Golden Promise (WT) wurde mit *Bgl*III bzw. *Bcu*I restringiert und in einer Southernblotanalyse untersucht. Die Detektion erfolgte mit der *gus*-spezifischen Sonde GUS1/2 (2.1.7). **B** Schematische Darstellung der Restriktionsschnittstellen von *Bgl*III und *Bcu*I im GTDsB-Konstrukt. Das GTDsB-Konstrukt ist farbig dargestellt, angrenzende Sequenzen grau. Die Bindestelle der *gus*-spezifischen Sonde ist markiert.

3.2.2 Transposition von GTDsB in der GT-F2-Population

Die Untersuchung von mehreren Nachkommen einer GT-F1-Linie erlaubt Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der Transposition. Wenn viele oder alle Nachkommen einer GT-F1-Pflanze das gleiche Muster an Hybridisierungssignalen zeigen, weist das auf eine frühe Transposition von GTDsB in der GT-F1-Generation hin. Die Detektion von einzigartigen Hybridisierungssignalen in einer GT-F2-Pflanze hingegen deutet auf eine germinale Transposition in der F1-Generation oder auf eine somatische Transposition in der GT-F2-Generation hin. Ereignisse, die auf einer einzigen Transposition des GTDsB-Konstrukts zurückzuführen sind, werden als unabhängig bezeichnet.

Die 191 Pflanzen der GT-F2-Population wurden in Southernblotanalysen (2.2.12) auf Transpositionen des GTDsB-Konstrukts untersucht. Für die Analysen wurden die Restriktionsenzyme *Bgl*II, *Bcu*I und *Mun*I verwendet, die alle nur einmal im GTDsB-Konstrukt schneiden. Beispiele für die Detektion von Transpositionen von GTDsB in der GT-F2-Population sind in Abb. 10 gezeigt. Die vollständigen Ergebnisse der Untersuchungen zur Transposition des GTDsB-Konstrukts in der GT-F1- und GT-F2-Population sind in Tab. 6 zusammengefasst.

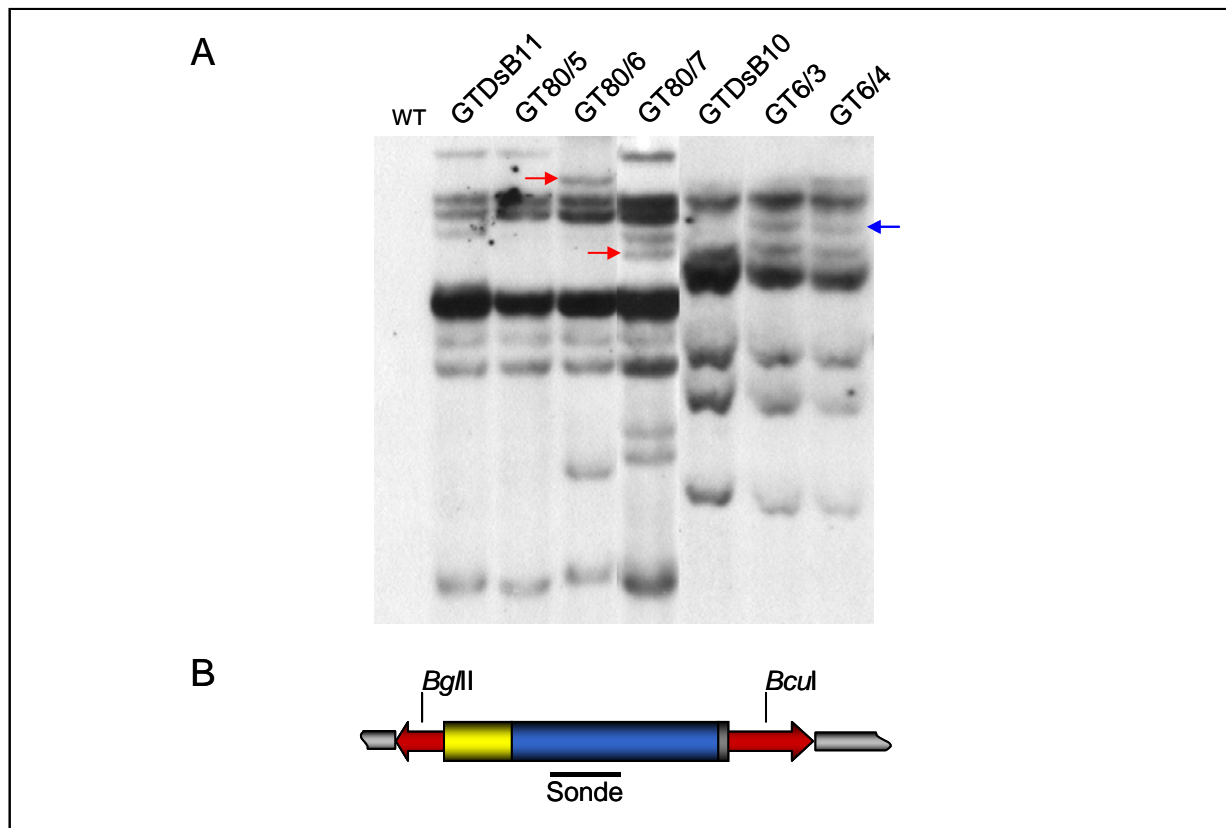


Abb. 10: Beispiele für die Detektion von Transposition des GTDsB-Konstrukts in der GT-F2-Population

A Genomische DNA der Parentallinie GTDsB11, von den drei Nachkommen GT80/5, GT80/6 und GT80/7 sowie genomische DNA des Wildtyps Golden Promise (WT) wurde mit *Bcl*I restringiert. Genomische DNA der Parentallinie GTDsB10 sowie von den Nachkommen GT6/3 und GT6/4 wurde mit *Bgl*II restringiert. Die Detektion der Restriktionsfragmente in einer Southernblotanalyse erfolgte mit der *gus*-spezifischen Sonde GUS1/2 (2.1.7). Zwei Hybridisierungssignale, die unabhängige Transpositionereignisse in den Linien GT80/6 und GT80/7 indizieren, sind durch rote Pfeile markiert. Der blaue Pfeil markiert ein Hybridisierungssignal, welches auf ein Transpositionereignis hinweist, dass an zwei Nachkommen, GT6/3 und GT6/4, weitergegeben wurde. **B** Schematische Darstellung der Restriktionsschnittstellen von *Bgl*II und *Bcl*I im GTDsB-Konstrukt. Das GTDsB-Konstrukt ist farbig dargestellt, angrenzende Sequenzen grau. Die Bindestelle der *gus*-spezifischen Sonde ist markiert.

In den GT-F2-Pflanzen GT80/6 und GT80/7 konnte in der Southernblotanalyse jeweils ein Hybridisierungssignal detektiert werden, welches in der entsprechenden Parentallinie GTDsB 11 nicht vorhanden ist (Abb. 10 A). Die Detektion von zwei Hybridisierungssignalen unterschiedlicher Größe weist auf zwei unabhängige Transpositionen des GTDsB-Konstrukts hin. In der Pflanze GT80/5 hingegen konnte kein im Vergleich zur Parentallinie neues Hybridisierungssignal detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte in den F2-Pflanzen GT6/3 und GT6/4 das gleiche Hybridisierungssignal, welches nicht in der Parentallinie GTDsB 10 vorhanden ist, detektiert werden (Abb. 10 A). Dieses Signal ist wahrscheinlich auf eine einzige Transposition des GTDsB-Konstrukts zurückzuführen.

Tab. 6: Transposition von GTDsB in der GT-F1- und GT-F2-Generation

Parentalgeneration			GT-F1-Generation		GT-F2-Generation			
GTDsB-Linie	GTDsB-Integr. ^a	TPase-Linie	Anzahl Pflanzen ^b	Transp. ^c	F1-Elter	Anzahl Pflanzen ^b	Transp. ^c	Unabh. Transp. ^d
2a	1-2	DHcw21	3	-	GT32	6	3	1
		DHcw42	6	-	GT73	4	4	1
		cw74	1	-	-			
2d	1-2	DHcw42	3	-	-			
23	1-2	DHcw21	4	-	GT33	4	1	1
		cw34	2	1	GT29	4	4	3
		DHcw42	1	-	GT39	1	1	1
		cw74	4	3	GT41	5	5	2
31B	2	DHcw42	4	-	GT49	4	2	1
		cw74	5	2	GT54	5	3	1
6c,6a	2-4	DHcw21	1	-	GT70	4	-	-
		DHcw42	1	-	GT67	7	-	-
		cw74	2	-	GT4	7	5	5
31A	4	DHcw21	2	-	GT38	6	6	2
		DHcw42	1	-	-			
		cw74	6	1	GT52	5	-	-
16	3-5	DHcw21	2	-	GT19	4	3	1
		cw74	2	-	GT37	7	2	2
		cw74	2	-	GT40	4	4	2
14A	5-6	DHcw42	2	-	GT13	4	3	1
		cw74	3	-	GT22	5	-	-
11	5-8	cw34	1	1	GT82	3	3	1
		DHcw42	1	-	GT66	3	-	-
		cw74	2	-	GT80	54	16	10
10	6-7	DHcw21	4	-	GT9	7	-	-
		DHcw42	3	-	GT2	7	-	-
		cw74	2	-	GT6	7	1	1
14B	8-10	DHcw21	2	-	GT23	4	2	2
		cw74	3	1	GT15	8	3	3
26	12	DHcw21	2	-	GT35	4	3	3
		cw74	2	-	GT63	8	5	5
Summe			79	9 (11%) ^e	28	191	79	49(26%) ^e

^a Integrationsloci des GTDsB-Konstrukts (3.1.1, Tab. 3).

^b Anzahl der GT-F1-bzw. GT-F2-Pflanzen, die in Southernblotanalysen untersucht wurden.

^c Anzahl der Pflanzen mit Transposition des GTDsB-Konstrukts.

^d Anzahl der unabhängigen Transpositionsergebnisse.

^e In Klammern angegeben ist die Transpositionsfrequenz in der GT-F1- bzw. GT-F2-Generation.

Insgesamt konnten in der GT-F2-Population in 49 Pflanzen unabhängige Transpositionen des GTDsB-Konstrukts detektiert werden. Das entspricht einer Frequenz von 26%. In den Nachkommen von insgesamt 21 der 28 repräsentierten GT-F1-Linien treten Transpositionen auf. Transpositionen von GTDsB konnten, da die Linien GTDsB 2a und 2d als klonal betrachtet werden, in den Nachkommen aller 11 GTDsB-Parentallinien nachgewiesen werden.

3.3 Phänotypische Abweichungen in der GT-F2-Population

Die Pflanzen der GT-F2-Population wurden während ihrer gesamten Entwicklung beobachtet und sichtbare Abweichungen vom Phänotyp des Wildtyps protokolliert. In insgesamt 15% (29/191) der Pflanzen der GT-F2-Population konnten sichtbare Abweichungen vom Wildtyp-Phänotyp festgestellt werden (Tab. 7).

Tab. 7: Pflanzen der GT-F2-Population mit Abweichungen vom Wildtyp-Phänotyp

	Anzahl der GT-F2-Pflanzen
Gestauchtes Wachstum	14
Abweichende Blattpigmentation	10
Reduzierte Fertilität	7
Sonstige phänotypische Abweichungen	8
Insgesamt untersucht	191
Insgesamt mit Abweichungen ^a	29

^a in 10 Pflanzen konnten gleichzeitig mehrere Abweichungen festgestellt werden

Am häufigsten wurden reduzierte Fertilität, Veränderungen der Pigmentation der Blätter und gestauchtes Wachstum beobachtet. Jeweils ein Beispiel für diese Abweichungen ist in Abb. 11 gezeigt. Zusätzlich traten in einigen GT-F2-Pflanzen verkürzte oder krumme Grannen, stark geknickte Nodien, ein verlangsamtes Wachstum und eine veränderte Pigmentierung beim Abreifen auf. In 10 von 29 Pflanzen mit Abweichungen (34%) traten gleichzeitig mehrere Veränderungen des Phänotyps auf. Die in Abb. 11 exemplarisch abgebildete Pflanze GT22/4 zeigte neben einer abweichenden Pigmentation in den Blättern ein stark gestauchtes, buschiges Wachstum.

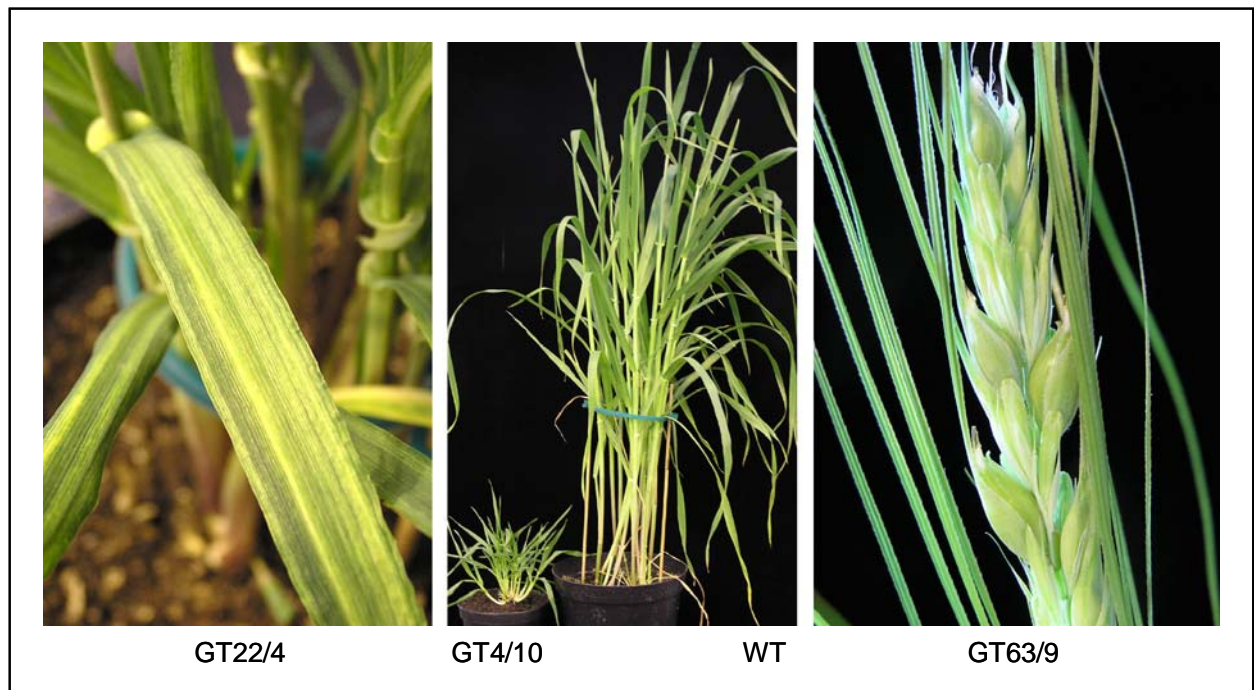


Abb. 11: GT-F2-Pflanzen mit Abweichungen vom Wildtyp-Phänotyp

Exemplarisch gezeigt sind ein gelb-gestreiftes Blatt der Pflanze GT22/4, die stark gestaucht wachsende Pflanze GT4/10 im Vergleich zu einem gleichaltrigen Spross des Wildtyps Golden Promise (WT) und eine Ähre der Pflanze GT63/9 mit reduzierter Fertilität.

Erkenntnisse über den möglichen Zusammenhang zwischen den phänotypischen Abweichungen und Insertionen des GTDsB-Konstrukts müssen in weiteren Analysen erarbeitet werden.

3.4 Untersuchungen zur Expression des *gus*-Reportergens

Bei den Untersuchungen zur Reporter-gen-Expression in einem *gene trap*-System ergeben sich folgende generelle Problemstellungen. Ort und Zeitpunkt der potentiellen Expression des *gus*-Reportergens sind unbekannt. Daraus ergibt sich die Frage welches Gewebe zu welchem Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung histochemisch analysiert werden muss. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Identifizierung von Ereignissen der GUS-Expression die an die Nachkommen vererbt werden. Nur diese können mit dem Ziel der Identifizierung des verantwortlichen Gens genau analysiert werden. Es ergibt sich daher die Frage, wie diese differenziert werden können. Des Weiteren ist zu beachten, dass in dem untersuchten System die Frequenz der GUS-Expression von der Transpositionsfrequenz des GTDsB-Konstrukts abhängig ist, da nicht auf Pflanzen mit transponierten GTDsB-Konstrukten selektiert wurde. Zudem ist die Populationsgröße limitiert. Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen zur GUS-Expression in der GT-F2-Population wurden daher so konzipiert, dass auf der Basis des vorhandenen Materials eine Aussage zur Expression des *gus*-Reportergens in dem hier vorgestellten *gene trap*-System möglich ist.

3.4.1 Auswahl der Explantate für die histochemischen Analysen der GT-F2-Population

Bei der Konzeption der Untersuchungen zur GUS-Expression musste zunächst folgende Frage geklärt werden: Welche Organe von welchen Entwicklungsstadien stellen sinnvolle Explantate für die Analysen dar?

Da Ort und Zeitpunkt der GUS-Expression unbekannte Faktoren sind, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit GUS-Expression zu detektieren, wenn erstens möglichst viele Organe definierter Entwicklungsstadien und zweitens Organe, die einen hohen Anteil an sich teilenden und differenzierenden Geweben aufweisen, analysiert werden. Ein weiterer Punkt, der beachtet werden muss, ist die Erhaltung der jeweiligen GT-Linie. Folglich können nicht alle Organe der Reproduktion einer Pflanze für die Untersuchungen verbraucht werden.

Auf der Basis dieser Überlegungen wurden die folgenden Organe ausgewählt: Blatt, Nodium, Blüte, Korn und Keimling (Abb. 12). Die Blätter, Nodien und Blüten wurden im Entwicklungsstadium 49 der Gerste nach Zadoks (Chang *et al.* 1974) analysiert. Zu diesem Zeitpunkt sind die Blüten unbefruchtet. Von den Blüten wurde ein weiterer Zeitpunkt der Entwicklung, 65-69 nach Zadoks, untersucht, zu welchem sie bereits polliniert sind. Ein Teil der befruchteten und unbefruchteten Blüten wurde mit den sterilen Seitenblüten gefärbt. Sterile Seitenblüten sind bei der in dieser Arbeit verwendeten, zweizeiligen Sommergerste Golden Promise (2.2.8) beidseitig an jeder Blüte vorhanden. Die Körner wurden im Entwicklungsstadium 83-85 nach Zadoks geerntet. In den Körnern sind sowohl Gewebe der

F2-Generation (Perikarp) als auch Gewebe der F3-Generation (Endosperm, Embryo) vertreten. Von den Keimlingen der GT-F3-Generation wurde das Entwicklungsstadium 10 nach Zadoks untersucht.

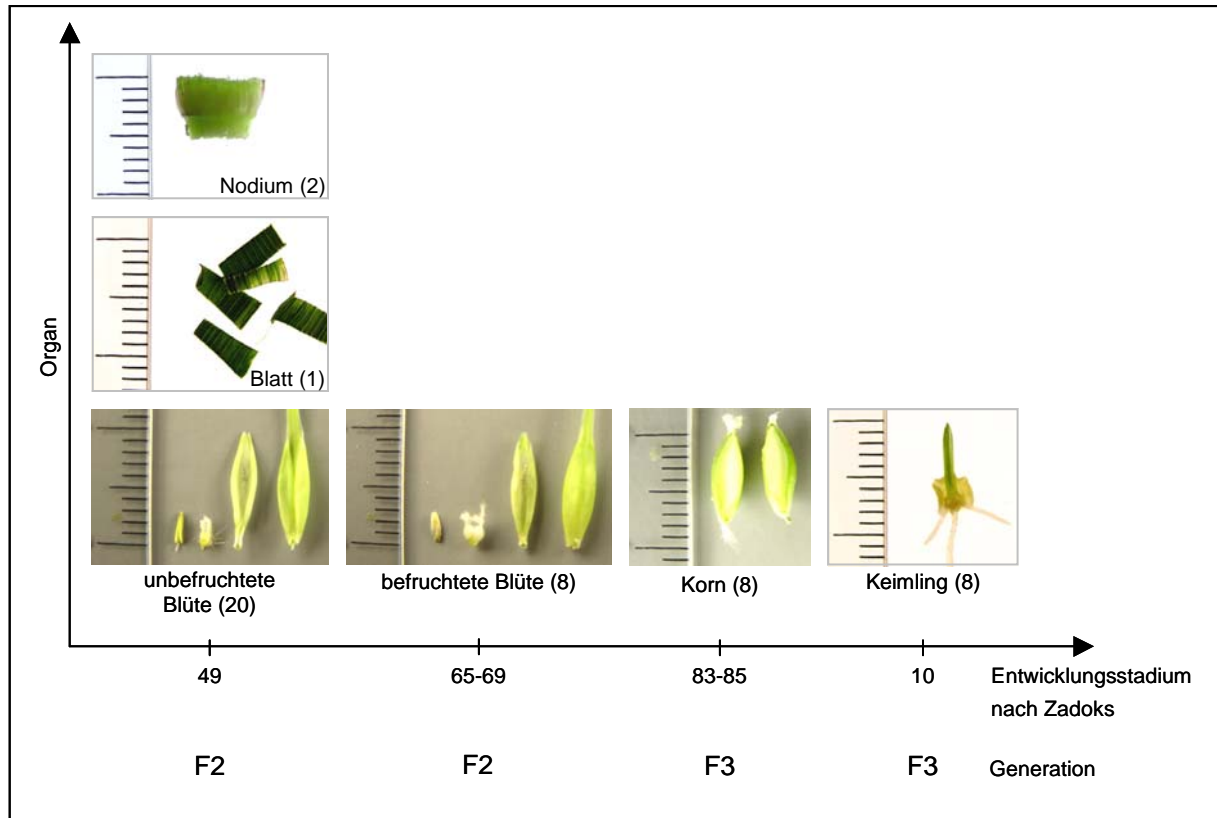


Abb. 12: Für Untersuchungen zur GUS-Expression in der GT-F2-Population ausgewählte Organe

Die für die histochemischen GUS-Färbungen ausgewählten Organe sind in Abhängigkeit von den Entwicklungsstadien einer Gerstenpflanze nach Zadoks (Chang *et al.* 1974) dargestellt. Die entsprechende GT-Generation ist angegeben. In Klammern angegeben ist die Anzahl der vom jeweiligen Organtyp pro Pflanze untersuchten Explantate.

Die Reporter-gen-Expression wird von der spezifischen Expression des endogenen Gens determiniert, in das das *gene trap*-Konstrukt integriert ist. In einem Transposon-basierten *gene trap*-System hat zusätzlich der Zeitpunkt der Transposition des *gene trap*-Konstrukts einen Einfluss auf die detektierbare Reporter-gen-Expression. Die Transposition des GTDsB-Konstrukts kann in somatischem Gewebe erfolgen. Auch die Möglichkeit der GUS-Expression ist dann auf das betroffene, somatische Gewebe begrenzt. Solche Ereignisse werden größtenteils nicht an die Nachkommen vererbt. Nur Ereignisse, die an die Nachkommen weitergegeben werden, können in weiteren Analysen genau charakterisiert werden und zur Isolierung von Genen führen. Somit ist die Identifizierung von GUS-Expression interessant, die die Folge einer Transposition des GTDsB-Konstrukts ist, die vererbt wird. Die Differenzierung solcher Ereignisse kann über die histochemische Färbung mehrerer Explantate des jeweiligen Organtyps einer Pflanze erfolgen.

Für die sichtbare GUS-Expression sind dann stark vereinfacht zwei Möglichkeiten denkbar:

1. Mehrere oder alle Explantate eines Organtyps zeigen die gleiche GUS-Expression (Abb. 13 oben). Dafür können eine frühe Transposition des GTDsB-Konstrukts, sowie eine germinale Transposition in der GT-F1-Generation und eine frühe Transposition in der GT-F2-Generation verantwortlich sein. Diese Ereignisse werden im Folgenden unter dem Begriff „vererbbar“ zusammengefasst.
2. Nur ein Explantat eines Organtyps einer GT-F2-Pflanze zeigt GUS-Expression (Abb. 13 unten). Diese GUS-Expression ist der Hinweis auf eine somatische Transposition von GTDsB in der GT-F2- bzw. GT-F3-Generation. Solche Ereignisse werden nicht vererbt. Strenggenommen kann im Fall der Körner und Keimlinge auch eine germinale Transposition des GTDsB-Konstrukts in der GT-F2-Generation dazu führen.

Unabhängig von einer Transposition kann auch die Integration des GTDsB-Konstrukts in eine exprimierte genomische Sequenz bei der Transformation zur Expression des *gus*-Reportergens führen. In diesem Fall wird eine GUS-Expression in allen Explantaten des Organs einer Pflanze und in allen Nachkommen der entsprechenden GTDsB-Parentallinie erwartet. Die Differenzierung dieser Möglichkeit kann über die histochemische Analyse der entsprechenden GTDsB-Parentallinie erfolgen.



Abb. 13: Schematische Darstellung des experimentellen Ansatz zur Differenzierung von vererbbaaren und somatischen Ereignissen

Symbolisch dargestellt ist eine Pflanze der GT-F2-Generation sowie mehrere Nachkommen dieser im Keimlingsstadium (GT-F3-Generation). Stark vereinfacht betrachtet, weist die gleiche GUS-Expression in 75% der getesteten Keimlinge einer Pflanze auf eine Expression des *gus*-Reportergens infolge einer vererbten Transposition von GTDsB hin (oben). Dabei muss berücksichtigt werden, dass bei der Vererbung von hemizygoten GTDsB-Integrationsloci nur in 75% der Nachkommen eine GUS-Expression erwartet werden kann. Die Expression des *gus*-Reportergens in nur einem der Explantate ist ein Hinweis auf somatische Transposition des GTDsB-Konstrukts, die nicht vererbt wird (unten). Weitere Erklärungen dazu befinden sich im Text.

Es gibt noch weitere Punkte, die bei der Betrachtung der Ergebnisse der histochemischen Analyse der GT-F2-Population beachtet werden müssen. Im Fall der Analyse von Geweben der GT-F3-Generation muss die Vererbung der GTDsB-Konstrukte berücksichtigt werden. Liegt die für die GUS-Expression verantwortliche Integration des GTDsB-Konstrukts in der GT-F2-Pflanze im hemizygoten Status vor, wird sie nur an 75% der Nachkommen vererbt. Folglich kann statistisch gesehen nur in maximal 75% dieser Nachkommen die spezifische GUS-Expression detektiert werden. Dieser Fall ist in Abb. 13 (oben) schematisch dargestellt. Das Reporter-gen kann infolge einer zeitlich sehr begrenzten Expression des endogenen Gens nur zu einem sehr spezifischen Zeitpunkt der Entwicklung des jeweiligen Organs exprimiert werden. Es ist vorstellbar, dass in so einem Fall aufgrund von individuellen Entwicklungsunterschieden nicht in allen Explantaten eine GUS-Expression detektiert werden kann.

Es wurde entschieden jeweils ein Blatt, zwei Nodien, ca. 20 unbefruchtete Blüten, 8 befruchtete Blüten, 8 Körner und 8 Keimlinge von einer GT-F2-Pflanze zu analysieren (Abb. 12). Mit dem experimentellen Ansatz für die Blätter und Nodien können Ereignisse detektiert werden, welche auf einer Transposition des GTDsB-Konstrukts in der GT-F1-Generation oder frühen Transposition von GTDsB in einem Halm der GT-F2-Pflanze beruhen.

3.4.2 Etablierung des GUS-Färbeprotokolls

Das Ziel war die Anpassung des GUS-Färbeprotokolls an die Anforderungen der histochemischen Analyse der GT-F2-Population. Ein wichtiger Punkt dabei war die Standardisierung der Arbeitsabläufe, um die Reproduzierbarkeit der Methode bei der großen Probenzahl zu gewährleisten. Dabei wurde das Protokoll für die GUS-Färbung nach den Vorlagen von Jefferson *et al.* (1987) und Dai *et al.* (1996) modifiziert. Es wurden die Zerkleinerung des Gewebes, die Zusammensetzung des GUS-Färbepuffers und die Dauer der Inkubation mit dem GUS-Färbepuffer auf das System Gerste spezifisch eingestellt.

Alle Explantate wurden nach standardisierten Abläufen auf die histochemische GUS-Färbung vorbereitet (Tab. 2) und anschließend gefärbt. Die Blätter, Nodien und Blüten wurden mit 90% Aceton vorbehandelt. Die Epidermis dieser Gewebe weist eine wasserabweisende Wachsschicht auf. Durch die Vorbehandlung mit Aceton sollte ein besserer Eintritt der wässrigen GUS-Färbelösung ermöglicht werden. In vielen Protokollen zur histochemischen GUS-Färbung werden der GUS-Färbelösung jeweils 0,1 bis 0,5 mM Ferri- und Ferrocyano- id als Katalysatoren zur Bildung des histochemisch nachweisbaren Produktes zugesetzt. Auf den Zusatz von Ferri- und Ferrocyano- id wurde verzichtet, da eine Gelbfärbung der Präparate festgestellt wurde. Diese kann die Auswertung hellblauer Signale erschweren. Während der GUS-Färbung entstehen in vielen Geweben phenolische Verbindungen, die das Gewebe braun verfärben können. Es erschien daher wichtig die optimale Inkubationszeit für die GUS-Färbung eines Organs experimentell zu ermitteln. Obwohl die Blüten nach einer Färbedauer von sechs Stunden leicht gelb wurden, wurde als Kompromiss bezüglich der

praktischen Durchführbarkeit für alle Explantate eine Färbedauer von 24 Stunden festgelegt. Das endgültige GUS-Färbeprotokoll ist unter 2.2.16 angegeben.

Nach der GUS-Färbung und der Entfärbung grüner Gewebe mit Hilfe von Ethanol erfolgte die Durchmusterung der Präparate mit der Hilfe eines Binokulars. Die einzelnen Explantate wurden dabei nach standardisierten Arbeitsschritten präpariert (Tab. 2). Die Durchmusterung der Präparate erfolgte in Zusammenarbeit mit Stephanie Lütticke.

Im Hinblick auf die Bewertung von GUS-Signalen wurden im Vorfeld zwei Fragen untersucht:

1. Gibt es in den analysierten Organen möglicherweise endogene Aktivitäten?
2. Können alle Gewebe der Explantate gleich gut eingefärbt werden?

Endogene Aktivität kann durch eine unspezifische Spaltung des Substrates X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Glucuronsäure) bei leicht saurem pH (5.5-6.0) entstehen. Diese Reaktion kann durch die Anwesenheit von Peroxidasen unterstützt werden. Zudem können einzelne Gewebe Aktivitäten aufweisen, die das Substrat degradieren. Zur Bearbeitung der Fragestellung wurden Explantate der ausgewählten Organe (Abb. 12) von drei Golden Promise-Wildtyp-Pflanzen nach dem standardisierten GUS-Färbeprotokoll (2.2.16) gefärbt. Informationen über mögliche endogene Aktivitäten ergeben sich zusätzlich aus der großen Zahl an gefärbten Explantaten der GT-F2-Population. Findet sich eine endogene Aktivität, dann müsste diese in allen oder zumindest in der Mehrzahl der Explantate auftreten. Aus den Analysen des Wildtyps und der GT-F2-Population haben sich keine Hinweise auf endogene Aktivitäten in den untersuchten Organen ergeben.

Die Bearbeitung der zweiten Fragestellung ist durch die histochemische GUS-Färbung (2.2.16) der entsprechenden Organe (Abb. 12) einer unter Kontrolle des *actin*-Promotors GUS-exprimierenden Linie (2.1.8) erfolgt. Diese Untersuchung bietet eine gute Möglichkeit, Informationen über die Färbbarkeit der einzelnen Organe zu erhalten. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der aus Reis stammende *actin*-Promotor in manchen Geweben der Gerste nicht aktiv ist. Es konnte beobachtet werden, dass in den Blüten der Fruchtknoten in der Mitte weniger stark gefärbt wird als am Grund und an den Narben. Das kann ein Hinweis darauf sein, dass der Zugang des GUS-Färbepuffers zum Fruchtknoten erschwert ist, obwohl die Gerstenblüten an der Spitze aufgeschnitten wurden (Tab. 2). Zusammenfassend haben die Analysen gezeigt, dass prinzipiell alle Gewebe, die für die histochemischen Untersuchungen der GT-F2-Population ausgewählten Organe, für eine GUS-Färbung empfänglich sind.

3.4.3 Durchmusterung der GT-F2-Explantate auf Expression von GUS

Die Expression des *gus*-Reportergens wurde in 141 Pflanzen der GT-F2-Population untersucht. Dafür mussten von jeder Pflanze zu vier definierten Zeitpunkten ihrer Entwicklung Explantate geerntet und verarbeitet werden. Die Durchführung dieses logistisch anspruchsvollen Experiments wurde durch die sukzessive Anzucht der 141 Pflanzen der GT-F2-Population, der Standardisierung der einzelnen Arbeitsschritte und der Zusammenarbeit mit Meike Andermann und Sabine Grünberg ermöglicht. So konnten von 86 der 141 GT-F2-Pflanzen alle ausgewählten Organe im histochemischen GUS-Assay analysiert werden. Von den verbleibenden 54 Pflanzen wurde ein überwiegender Teil der Explantate geerntet und bearbeitet.

Insgesamt wurden 5134 Explantate der GT-F2-Population mit histochemischer GUS-Färbung analysiert (Tab. 8). Dabei wurden Explantate von jedem der sechs ausgewählten Organe von mindestens 99 GT-F2-Pflanzen geerntet und untersucht.

Tab. 8: Im histochemischen GUS-Assay getestete Explantate

Organ	Anzahl der F2-Linien ^a	Explantate gesamt ^b
Blatt	99	99
Nodium	99	186
unbefruchtete Blüte	99	1860
befruchtete Blüte	104	789
Korn	134	1110
Keimling	138	1096
Summe		5134

^a Anzahl der GT-F2-Pflanzen von denen die jeweiligen Organe getestet wurden.

^b Summe der Explantate, die von dem jeweiligen Organ in der GT-F2-Population getestet wurden.

Die Ergebnisse der Durchmusterung der GT-F2-Population sind in Tab. 9 zusammengefasst. In 72 der 141 analysierten GT-F2-Pflanzen konnte eine Expression des *gus*-Reportergens detektiert werden (Tab. 9). Das entspricht einer Frequenz von 51%. Dabei konnte in Nachkommen aus Kreuzungen von jeder der 11 vertretenen GTDsB-Parentallinien GUS-Expression detektiert werden. In den Nachkommen von vier der 28 analysierten F1-Linien, GT33, GT39, GT4 und GT40, konnte keine GUS-Expression detektiert werden. Dabei war für die Linie GT39 die Wahrscheinlichkeit GUS-Expression zu detektieren von vornherein klein, da nur eine Pflanze analysiert wurde.

In jedem der untersuchten Organe konnte GUS-Expression detektiert werden. In 47 der GUS-positiven Pflanzen beschränkte sich die GUS-Expression auf ein Organ. In 19 weiteren Pflanzen beschränkte sich die GUS-Expression auf zwei verschiedene Organe. In fünf Pflanzen konnte GUS-Expression in drei oder vier verschiedenen Organen detektiert werden. GUS-Expression in allen sechs Organen trat ausschließlich in der F2-Pflanze GT80/3 auf (Daten nicht gezeigt).

Tab. 9: GUS-Expression in der GT-F2-Population

GTDsB-Linie	GT-F1-Linie	Analysierte Pflanzen	Pflanzen mit GUS-Expression	Organe mit GUS-Expression (Anzahl der Explantate)
2a	GT32	6	2	Korn (1), Keimling (1)
	GT73	4	1	Korn (1)
23	GT33	4	-	-
	GT29	4 ^(1c)	2	befr. Blüte (1), Keimling (1)
	GT39	1	-	-
	GT41	5	3	befr. Blüte (13), Korn (4), Keimling (1)
31B	GT49	4	2	befr. Blüte (2), Keimling (1)
	GT54	5	4	unbefr. (7) + befr. (1) Blüte, Korn (10), Keimling (15)
6a, 6c ⁱ	GT70	4	1	befr. Blüte (1), Nodium (1)
	GT67	7	4	Nodium (4), Blatt (1)
	GT4	7 ^(1a)	-	-
31A	GT38	6	1	Keimling (1)
	GT52	5 ^(1d/1e)	4	Nodium (1), Korn (10)
16	GT19	4 ^(b)	1	Korn (1)
	GT37	7	2	Korn (4), Keimling (1)
	GT40	4	-	-
14A	GT13	4 ^(2b/2c)	2	Korn (1), Keimling (7)
	GT22	5 ^(4b/1c)	4	Korn (2), Keimling (17)
11	GT82	3	3	unbefr. Blüte (1), Nodium (3), Blatt (1)
	GT66	3 ^(f)	2	befr. Blüte (3), Korn (1)
	GT80	4	4	unbefr. (3) + befr.(2) Blüte, Nodium (4), Blatt (1), Korn (9), Keimling (2)
10	GT9	7 ^(b)	2	Korn (2), Keimling (2)
	GT2	7 ^(6b/1c)	5	Korn (2), Keimling (4)
	GT6	7 ^(5b/2c)	4	Korn (6), Keimling (3)
14B	GT23	4 ^(2a/1d)	1	Keimling (1)
	GT15	8 ^(1b/3c)	7	befr. Blüte (9), Korn (12), Keimling (17)
26	GT35	4	4	unbefr. (41) + befr. (32) Blüte
	GT63	8	7	unbefr. Blüte (3), Korn (23), Keimling (2)
		141	72	

(Anzahl Pflanzen a) nur Keimlinge analysiert

(Anzahl Pflanzen b) nur Körner und Keimlinge analysiert

(Anzahl Pflanzen c) nur befruchtete Blüten, Körner und Keimlinge analysiert

(Anzahl Pflanzen d) keine befruchteten Blüten analysiert

(Anzahl Pflanzen e) keine Körner analysiert

(Anzahl Pflanzen f) nur unbefruchtete Blüten, Nodien und Blätter analysiert

ⁱ GTDsB 6a und 6c zeigten in Southernblotanalysen ein identisches GTDsB-Hybridisierungsmuster (3.1.1).

In Abb. 14 sind Beispiele für GUS-Expression in einer befruchteten Blüte und deren Seitenblüten, einem Nodium, dem Endosperm eines Kornes und dem Skutellum eines Keimlings gezeigt. In der Blüte und vor allem den Seitenblüten der Linie GT35/8 ist das Muster der GUS-Expression sehr distinkt und scheint auf ein spezifisches Gewebe beschränkt zu sein. In dem Nodium der Linie GT52/8 ist die GUS-Expression im Vergleich zur Blüte der Linie GT35/8 deutlich schwächer und nicht so klar abgegrenzt. Im Korn der Linie GT6/4 ist das Produkt der GUS-Reaktion auf einen Sektor im Endosperm begrenzt. Im Keimling der Linie GT37/6 konnte in einem klar abgegrenzten Sektor des Skutellums ein intensives GUS-Signal detektiert werden.

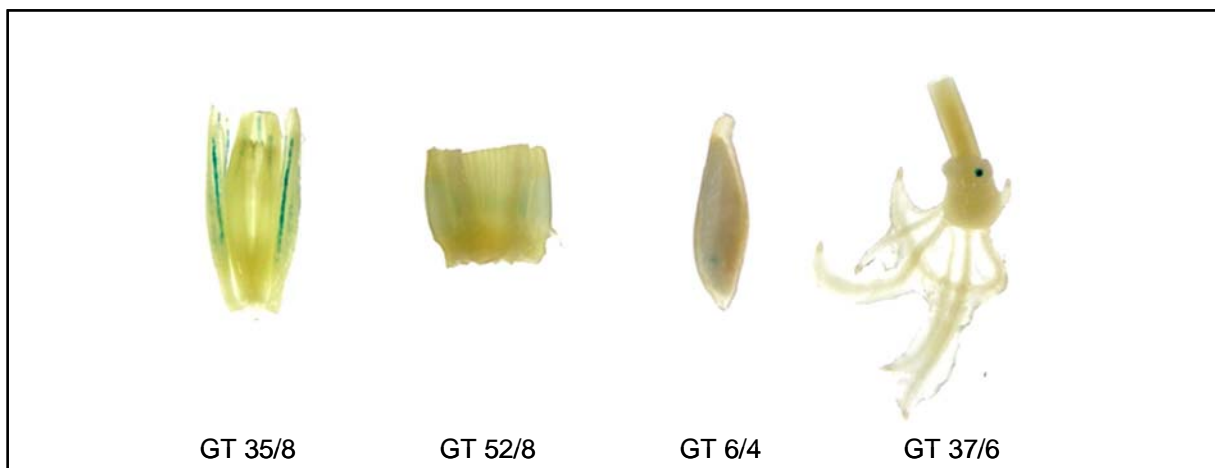


Abb. 14: GUS-Expression in verschiedenen Organen der GT-F2-Population

Exemplarisch gezeigt ist der Nachweis der Expression des *gus*-Reportergens nach histochemischer GUS-Färbung in einer Blüte und Seitenblüte der Linie GT35/8, in einem Nodium der Linie GT52/8, in einem Korn der Linie GT6/4 und in einem Keimling der Linie GT37/6.

Die GUS-Expression konnte in verschiedenen Geweben der untersuchten Organe der GT-F2-Population nachgewiesen werden. In den Blüten konnte GUS-Expression in Zellen der Deck- und Vorspelze, in Trichomen der Deckspelze, der Narbe und der äußeren Gewebeschicht des Fruchtknotens detektiert werden. Die Mehrzahl der GUS-Signale im Korn befand sich im Endosperm. Es konnten auch einige Signale im Perikarp gefunden werden. Im Keimling konnte die GUS-Expression hauptsächlich im Skutellum detektiert werden. Zusätzlich trat in einigen Keimlingen GUS-Expression in der Wurzel und den Wurzelhaaren auf. Die in den Nodien detektierten GUS-Expressionsmuster entsprachen mehrheitlich dem exemplarisch in Abb. 14 für die Linie GT52/8 abgebildeten.

Eine GUS-Expression im Blatt konnte nur in drei Explantaten detektiert werden (Tab. 9). Allerdings wurde mit nur einem Blatt pro Pflanze auch die geringste Zahl an Explantaten getestet. Die Wahrscheinlichkeit, GUS-Expression im Blatt zu finden, war daher von vornherein gering. Die GUS-Aktivität war in allen drei Explantaten entlang der Leitbündel lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesem Muster der Expression des Reportergens um ein Färbeartefakt als Folge der besseren Zugänglichkeit für den GUS-Färbepuffer handelt.

3.4.3.1 Frequenz der GUS-Expression in den einzelnen Organen

In der GT-F3-Generation können sich, zusätzlich zu den Ereignissen von Transposition und GUS-Expression in den vorangegangenen Generationen, Ereignisse in den Keimbahn-kompetenten Zellen der GT-F2-Generation und frühe somatische Ereignisse der GT-F3-Generation manifestieren. Würde das zutreffen, wäre eine höhere Frequenz der GUS-Expression in F3-Geweben zu erwarten. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden die Frequenzen an GUS-Expression für die einzelnen Organe der 86 GT-F2-Pflanzen berechnet, von denen alle Organe geerntet wurden (Tab. 10).

Tab. 10: Frequenz der GUS-Expression in verschiedenen Organen der GT-F2-Population

Organ	Getestet ^a	GUS ^b	Frequenz (%)
Blatt	86	3	3,5
Nodium	86	12	14
unbefruchtete Blüte	86	7	8
befruchtete Blüte	86	10	12
Korn	86	24	28
Keimling	86	20	23

^a Anzahl der getesteten GT-F2-Pflanzen

^b Anzahl der GT-F2-Pflanzen mit GUS-Expression

Die Frequenz der GUS-Expression in den 86 GT-F2-Pflanzen schwankt in Abhängigkeit vom Organ. Nur in drei GT-F2-Pflanzen konnte eine Expression des Reportergens im Blatt detektiert werden. Diese mit 3,5% niedrige Frequenz ist damit erklärbar, dass mit einem Blatt pro Pflanze eine geringe Zahl an Explantaten getestet wurde. In den Nodien konnte die Expression des GUS-Reportergens in 12 von 86 GT-F2-Pflanzen detektiert werden. Die sich daraus ergebende Frequenz von 14% ist die dritthöchste. In den befruchteten Blüten konnte mit einer Frequenz von 12% mehr GUS-Expression als in den unbefruchteten Blüten detektiert werden. Die GUS-Expression in den befruchteten Blüten wurde mit Ausnahme von drei Pflanzen exklusiv in den Deck- und Vorspelzen der Blüten und Seitenblüten detektiert. In diesen drei Pflanzen, GT70/9, GT2/5 und GT9/8 konnte die GUS-Expression in der Narbe und auf der Oberfläche des Fruchtknotens nachgewiesen werden. Der überwiegende Teil der Signale in den befruchteten Blüten befindet sich somit nicht in Geweben, die direkt an der Befruchtung beteiligt sind. Ein Zusammenhang des Anstiegs der Frequenz an GUS-Expression in den befruchteten Blüten und dem Befruchtungsvorgang kann daher ausgeschlossen werden. Die höchsten Frequenzen der GUS-Expression von 28% und 23% traten in Körnern bzw. Keimlingen auf. Das zeigt einen Anstieg der Frequenz an GUS-Expression in Geweben der F3-Generation. Die GUS-Expression im Korn war mit Ausnahme von drei Fällen (GT13/6, GT2/5 und GT9/8) im Endosperm, einem Gewebe der F3-Generation, detektiert worden. Bei der Bewertung der Ergebnisse ist zu beachten, dass nicht von allen Organen die gleiche Anzahl an Explantaten untersucht wurde. Das Ergebnis kann als Hinweis auf einen Anstieg der GUS-Expression in der GT-F3-Generation infolge vererbter Transpositionereignisse der GT-F2-Generation und früher Transpositionen von GTDsB in der GT-F3-Generation gewertet werden.

3.4.3.2 Identifizierung von GT-Linien mit Hinweisen auf vererbare Ereignisse

Pflanzen der GT-F2-Population, in denen es Hinweise auf GUS-Expression nach Transpositionseignissen des GTDsB-Konstrukts gibt, die vererbt werden, sind interessante Kandidaten für weitere Analysen. Diese Ereignisse können in den Nachkommen durch den Verlust der Transposase im Rahmen des Zweikomponenten-Systems (Abb. 4) stabilisiert und im Detail analysiert werden. Die Erkennung solcher Ereignisse wird, wie in Kapitel 3.4.1 dargestellt wurde, durch das Färben von mehreren Explantaten eines Organtyps einer Pflanze ermöglicht.

Nach den unter 3.4.1 beschriebenen, theoretischen Überlegungen wurde entschieden, dass GT-F2-Pflanzen, in denen in mehr als 50% der getesteten Explantate eines Organtyps GUS-Expression detektiert werden kann, als Kandidaten für vererbare Ereignisse eingestuft werden. Diese sind in Tab. 11 zusammengefasst.

Für insgesamt sieben GT-F2-Pflanzen konnte eine Expression des *gus*-Reportergens in mehr als der Hälfte der acht getesteten Keimlinge festgestellt werden. Es handelt sich dabei um Nachkommen der vier F1-Linien GT54, GT13, GT22 und GT15 (Tab. 11). Die Linien GT13 und GT22 sind Nachkommen der gleichen GTDsB-Parentallinie GTDsB 14A (Tab. 9). Die GUS-Expression war bei allen ausschließlich im Skutellum lokalisiert. In den GT-F2-Pflanzen GT41/3 und GT15/9 konnte in 13 von 16 bzw. 9 von 9 getesteten befruchteten Blüten die Aktivität des Reporter gens in den Deck- und Vorspelzen detektiert werden. In neun von 16 analysierten Kornhälften der Pflanze GT63/4 konnte eine Expression des *gus*-Reporter gens im Endosperm detektiert werden. In den vier Nachkommen der F1-Linie GT35 konnte zusammengenommen in 50% der unbefruchteten Blüten und in 100% der befruchteten Blüten GUS-Expression detektiert werden.

Tab. 11: GT-F2-Pflanzen mit GUS-Expression in mindestens 50% der Explantate eines Organs

F2-Pflanze	Anzahl getesteter Explantate	Anzahl der Explantate mit GUS-Expression	Organ
GT41/3	16	13	befruchtete Blüte, Deck- u. Vorspelze
GT54/5	8	5	Keimling, Skutellum
GT54/10	8	5	Keimling, Skutellum
GT13/8	8	5	Keimling, Skutellum
GT22/3	8	6	Keimling, Skutellum
GT22/5	8	8	Keimling, Skutellum
GT15/2	8	5	Keimling, Skutellum
GT15/4	8	4	Keimling, Skutellum
GT15/9	9	9	befruchtete Blüte, Deck- u. Vorspelze
GT35/1,/3, /7 und /8	80 32	40 32	unbefr. Blüten, Deck- u. Vorspelze, Seitenblüten befr. Blüten, Deck- u. Vorspelze, Seitenblüten
GT63/4	16 ^a	9	Korn, Endosperm

^a Hierbei werden die von acht Körnern 16 analysierten Hälften berücksichtigt (2.2.16).

Die Auswertung der Ergebnisse zur GUS-Expression in den Nodien, in Bezug auf vererbare Transpositionereignisse von GTDsB, muss unter anderen Gesichtspunkten vorgenommen werden. Von den Nodien wurden jeweils nur zwei Explantate pro Pflanze analysiert. Auch wenn in den meisten Fällen nur in einem der beiden analysierten Nodien GUS-Expression detektiert werden konnte, indiziert das nicht zwangsläufig somatische Transpositionen des GTDsB-Konstrukts. Erkenntnisse über Hinweise auf GUS-Expression infolge vererbbarer Transpositionen von GTDsB können durch den Vergleich der jeweils von einer GT-F1-Linie analysierten Nachkommen und der Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Transposition des GTDsB-Konstrukts gewonnen werden und werden diskutiert (4.3).

Für die in Tab. 11 aufgeführten GT-F2-Linien liegen somit Hinweise für GUS-Expression als Folge von vererbaren Transpositionereignissen des GTDsB-Konstrukts vor. Wie bereits erwähnt, gibt es auch die Möglichkeit der Integration des GTDsB-Konstrukts in eine exprimierte genomische Sequenzen bei der Transformation. Erwartungsgemäß werden in beiden Fällen die Ereignisse an die nächste Generation weitervererbt. Die Differenzierung der beiden Möglichkeiten kann über die Betrachtung der weiteren GT-Linien erfolgen, die aus Kreuzungen der GTDsB-Parentallinie entstanden sind. Zusätzlich gibt die entsprechende histochemische Analyse der zugehörigen GTDsB-Parentallinie Aufschluss.

3.5 Analysen zur GUS-Expression der Linien GT35 und GTDsB 26

Die Untersuchungen zur GUS-Expression in der GT-F2-Population haben zur Identifizierung von GT-Linien geführt, die interessante Kandidaten für weitere Analysen sind (Tab. 11).

In den vier Nachkommen der Linie GT35 konnte eine Expression des *gus*-Reportergens in 40 von 80 getesteten unbefruchteten bzw. in allen 32 getesteten befruchteten Blüten detektiert werden (Tab. 11). Die GUS-Expression konnte in der Deck- und Vorspelze sowie in den Spelzen der sterilen Seitenblüten detektiert werden (Abb. 15 A). Die GUS-Färbung in den Spelzen der Seitenblüten war in allen Fällen stärker als in den Spelzen der Blüte. Die Dünnschnitte der Seitenblüten geben erste Hinweise darauf, dass die GUS-Expression in Zellen, die sich in räumlicher Nähe zu den Leitbündeln befinden, nachgewiesen werden kann (Abb. 14 B). Das Produkt der β -Glukuronidase-Reaktion konzentriert sich dabei entlang dreier Leitbündel der Deckspelzen der Blüten bzw. Seitenblüten. Während bei den Blüten die GUS-Färbung nur im oberen Teil der Blüte zu sehen war, konnte die GUS-Expression in der vollen Länge der Seitenblüten detektiert werden.

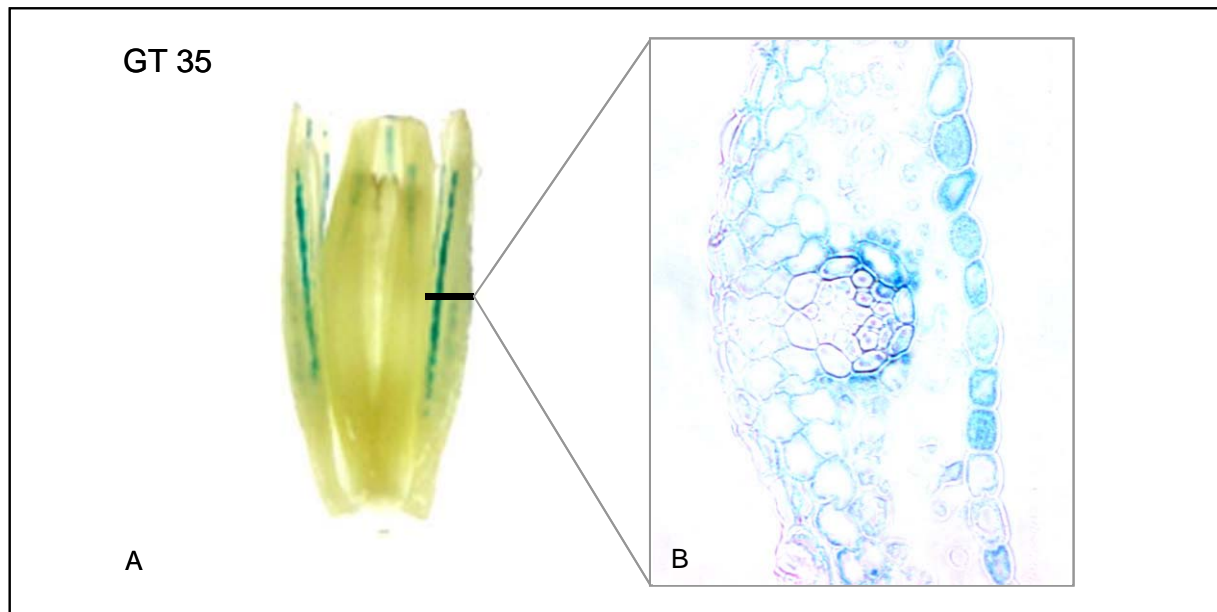


Abb. 15: GUS-Expression in den Blüten der Linie GT 35

Gezeigt ist exemplarisch eine befruchtete Blüte der Linie GT35 mit beiden sterilen Seitenblüten (A) und ein Ausschnitt von einem Dünnschnitt der sterilen Seitenblüte (B). Das Gewebe für den Dünnschnitt wurde nach dem histochemischen GUS-Assay ohne weitere Färbungen fixiert und geschnitten. Der Dünnschnitt wurde freundlicherweise von Frau I.Wachholz angefertigt.

3.5.1 Untersuchungen zur Transposition von GTDsB in der Linie GT35

Es gibt zwei Möglichkeiten, die zur GUS-Expression in allen Explantaten eines Organs einer Pflanze führen können:

1. Die in Kapitel 3.4.1 definierten vererbbaeren Transpositionen und
2. Die Integration des GTDsB-Konstrukts in eine exprimierte genomische Sequenz bei der Transformation.

In den Southernblotanalysen der Nachkommen der Linie GT35 konnten im Vergleich zur Parentallinie GTDsB 26 abweichende GTDsB-Hybridisierungssignale detektiert werden. Allerdings wurden in drei der vier Nachkommen der Linie GT35 drei unabhängige Transpositionen des GTDsB-Konstrukts detektiert (Tab. 6). Somit konnte kein Transpositionsereignis, dass für die gleichförmige GUS-Expression in allen vier Nachkommen verantwortlich sein kann, detektiert werden. Histochemische Analysen von Nachkommen der zugehörigen Parentallinie GTDsB 26 zeigen, dass diese das gleiche spezifische GUS-Expressionsmuster in den Blüten wie die Nachkommen der Linie GT35 aufweisen. In den Nachkommen der zweiten, aus Kreuzungen mit der gleichen Parentallinie GTDsB 26 hervorgegangenen F1-Linie konnte das GUS-Expressionsmuster in den Blüten allerdings nicht detektiert werden (Tab. 9). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Integration des GTDsB-Konstrukts bei der Transformation der Linie GTDsB 26 zu einem spezifischen GUS-Expressionsmuster führt. Die im folgenden dargestellten Analysen wurden mit Pflanzenmaterial der Linie GTDsB 26/1 bzw. deren aus Selbstung erhaltenen Nachkommen durchgeführt. Aufgrund der fehlenden Transposase ist das exprimierte GTDsB-Konstrukt an seinem Integrationslocus in der Linie GTDsB 26 stabil.

3.5.2 Untersuchungen zur entwicklungspezifischen GUS-Expression

Erste Hinweise zur GUS-Expression im Verlauf der Blütenentwicklung liefern die Ergebnisse der Untersuchungen zur GUS-Expression in den Nachkommen der Linie GT35. In 50% der unbefruchteten Blüten, aber in 100% der befruchteten Blüten konnte GUS-Expression detektiert werden (Tab. 11). Die sich daraus ergebende Frage ist: Ab welchem Zeitpunkt der Blütenentwicklung kann eine GUS-Expression in den Blüten detektiert werden?

Es wurden acht verschiedene Entwicklungsstadien von Blüten der Linie GTDsB 26/1 in einem GUS-Assay (2.2.16) histochemisch analysiert. Entsprechende Stadien des Wildtyps Golden Promise sind in Abb. 16 gezeigt. Die beiden ältesten Stadien entsprechen dabei den in den Untersuchungen der GT-F2-Population bereits analysierten (Abb. 12).

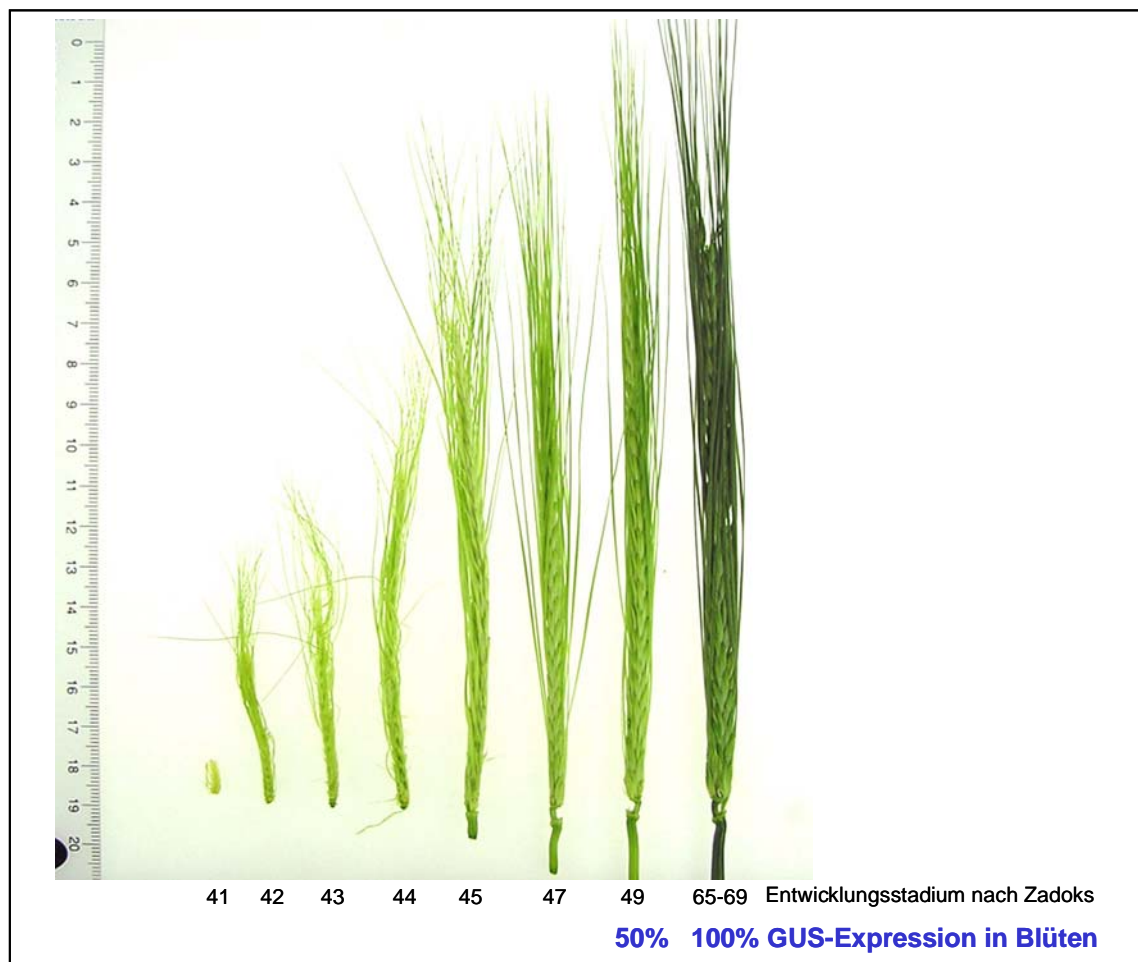


Abb. 16: Exemplarische Darstellung der Entwicklungsstadien, in denen GUS-Expression in den Blüten der Linie GTDsB 26/1 detektiert werden konnte

Gezeigt sind Ähren von acht nach dem Code von Zadoks klassifizierten (Chang *et al.* 1974) Entwicklungsstadien des Gerste-Wildtyps Golden Promise. Zu den Entwicklungsstadien in denen GUS-Expression in den Blüten der Linie GTDsB 26/1 detektiert werden konnte ist die Frequenz angegeben.

Eine Expression des *gus*-Reportergens konnte in Blüten der beiden ältesten Entwicklungsstadien 49 und 65-69 gefunden werden. In den jüngeren Entwicklungsstadien konnte keine GUS-Expression detektiert werden. Während eine GUS-Expression nicht in

allen untersuchten Blüten des Entwicklungsstadiums 49 nachgewiesen werden konnte, betrug die Frequenz an Blüten mit GUS-Expression im Entwicklungsstadium 65-69 100%. Zudem war die GUS-Färbung in den Blüten des Entwicklungsstadiums 65-69 intensiver. In Summe indizieren die Ergebnisse, dass die histochemisch nachweisbare GUS-Expression in den Blüten im Entwicklungsstadium 49 beginnt. Die Intensität der GUS-Färbung sowie die Anzahl an Blüten mit GUS-Expression nimmt im Entwicklungsstadium 65-69 zu.

3.5.3 Nachweis von *gus*-Transkripten

Der Fokus der molekularen Analysen zur GUS-Expression in den Blüten der Linie GTDsB 26/1 liegt in der Isolierung von *gus*-Fusionstranskripten. Diese können bei der Insertion des *gene trap*-Konstrukts in ein exprimiertes Gen entstehen (Abb. 1).

Als erster Schritt zur Isolierung der Sequenzen von möglichen *gus*-Fusionstranskripten musste folgende Frage geklärt werden: Sind in den Entwicklungsstadien der Blüten, in denen GUS-Expression detektiert wurde, *gus*-Transkripte vorhanden? Zusätzlich wurde untersucht, ob in anderen Geweben und ob in den Spelzen oder inneren Blütenorganen der Blüten der Linie GTDsB 26/1 *gus*-Transkripte nachgewiesen werden können.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde aus Blatt, Nodien, Deck- und Vorspelzen, Stempel und Staubblättern sowie sterilen Seitenblüten der Entwicklungsstadien 47, 49 und 65-69 nach Zadoks (Chang *et al.* 1974) Gesamt-RNA isoliert. Die Deck- und Vorspelzen sowie Stempel und Staubblätter entstammen Blüten des Entwicklungsstadiums 65-69. Die cDNA-Synthese mit gleichen Mengen an Gesamt-RNA erfolgte mit einem Oligo(dT)-Primer (2.2.7.1). Anschließend wurde eine RT-PCR mit den *gus*-spezifischen Primern GUSKL1 und GUSKL2 durchgeführt (2.2.7.1). Diese amplifizieren ein 494 bp-langes Fragment von *gus*. Um sicherzustellen, dass in allen Ansätzen die cDNA-Synthese erfolgreich war und vergleichbare Mengen an RNA eingesetzt worden waren, wurde von der gleichen cDNA-Synthese eine RT-PCR mit den Primern GAPDHup und GAPDHlow durchgeführt. Diese Primer amplifizieren ein 223 bp-langes Fragment aus dem in allen Geweben exprimierten GAPDH-Gen (2.2.7.1).

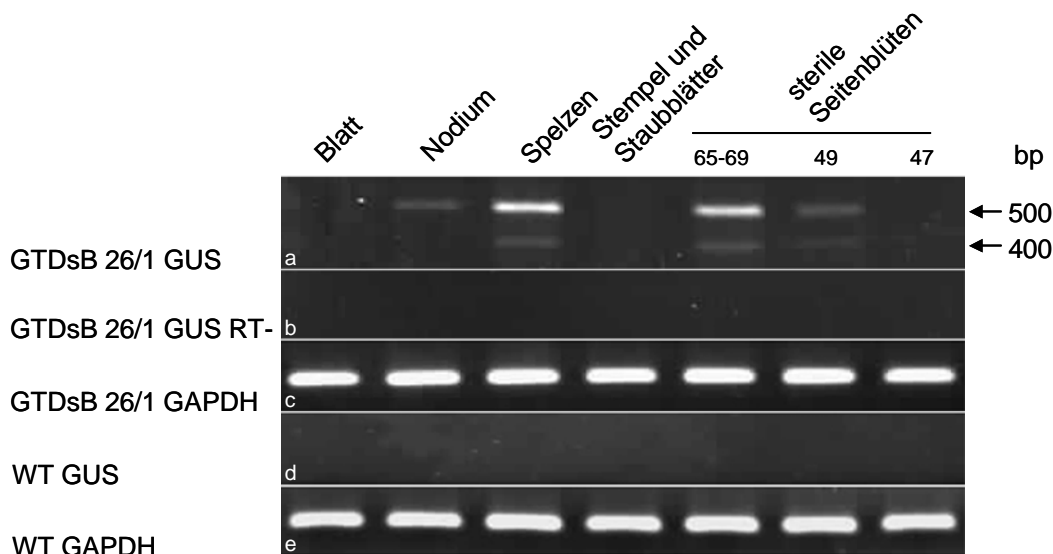


Abb. 17: RT-PCR mit Gesamt-RNA verschiedener Gewebe der Linie GTDsB 26/1

Mit Gesamt-RNA von Blatt, Nodium, Spelzen, Stempel und Staubblätter, sowie drei verschiedenen Entwicklungsstadien steriler Seitenblüten (47, 49, 65-69) wurde eine RT-PCR durchgeführt. Gezeigt sind die Amplifikate von cDNAs der Linie GTDsB 26/1 mit den *gus*-spezifischen Primern GUSKL1 und GUSKL2 (a) sowie den GAPDH-spezifischen Primern GAPDHup und GAPDHlow (c). GUS RT- ist der Reaktionsansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase zum cDNA-Syntheseschritt (b). Mit den entsprechenden cDNAs des Wildtyps Golden Promise (WT) wurde eine RT-PCR mit den gleichen zwei Primerpaaren durchgeführt (d und e). In bp angegeben sind die Größen der spezifischen PCR-Produkte.

Die stärkste Amplifikation des erwarteten PCR-Produkts mit einer Größe von 494 bp erfolgte in den Ansätzen mit Gesamt-RNA aus Spelzen und sterilen Seitenblüten des Entwicklungsstadiums 65-69 (Abb. 17 a). In den Ansätzen mit Gesamt-RNA aus Nodien sowie sterilen Seitenblüten des Entwicklungsstadiums 49 war die Amplifikation schwächer. In den Ansätzen mit RNA aus Blatt, Stempel und Staubblättern und sterilen Seitenblüten des Entwicklungsstadiums 47 konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden. In den Ansätzen mit RNA aus Spelzen und sterilen Seitenblüten des Entwicklungsstadiums 49 und 65-69 wurde zusätzlich ein *gus*-spezifisches DNA-Fragment mit einer Größe von 400 bp amplifiziert (Abb. 17 a). Gründe für die Amplifikation des kürzeren DNA-Fragments können unspezifische Bindungen der verwendeten Primer innerhalb des GUS-Fragments sein. Die Spezifität aller genannten PCR-Produkte wurde in einer Southernblotanalyse mit einer *gus*-spezifischen Sonde bestätigt.

In den Entwicklungsstadien 49 und 65-69 der Blüten, in denen histochemisch GUS-Expression detektiert wurde, konnten auch *gus*-Transkripte nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten in den Nodien *gus*-spezifische Amplifikate detektiert werden. In diesen war keine GUS-Expression nachgewiesen worden. Die stärkste Amplifikation von *gus*-spezifischen Sequenzen in den Spelzen und sterilen Seitenblüten des Entwicklungsstadiums 65-69 ist ein Hinweis darauf, dass das *gus*-Transkript dort in einer höheren Konzentration vorliegt. Als Ausgangsgewebe für die nachfolgenden molekularen Analysen dienen daher sterile Seitenblüten des Entwicklungsstadiums 65-69. Deren Verwendung bietet zudem den Vorteil, dass selbst wenn alle sterilen Seitenblüten einer Ähre entfernt werden, der Kornansatz dieser nicht gestört wird.

3.5.4 Nachweis von *gus*-Fusionstranskripten

Ein Vorteil der *gene trap*-Strategie ist die Möglichkeit der Isolierung von endogenen, exprimierten Sequenzen der Gerste mit der *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) (Frohman *et al.* 1988, Frohman und Martin 1989). Die Voraussetzung für diesen Ansatz ist die transkriptionale Fusion von endogenen Sequenzen an das 5'Ende vom *gus*-Transkript (Abb. 1). Im Vorfeld der Verfolgung dieser Strategie ist zu klären, ob in den Blüten der Linie GTDsB 26/1 eine Fusion des *gus*-Transkripts mit endogenen Transkripten vorliegt. Zum Nachweis von möglichen *gus*-Fusionstranskripten in der Linie GTDsB 26/1 wurde aus den sterilen Seitenblüten der Entwicklungsstadien 49 und 65-69 Gesamt-RNA isoliert (2.2.4). Das Vorhandensein spezifischer *gus*-Fusionstranskripte wurde in einer Northernblotanalyse (2.2.14) untersucht. Als Sonde wurde ein DIG-markiertes *gus-antisense*-Transkript eingesetzt (2.2.11). Zum Vergleich der Größe des *gus*-Transkripts ohne Fusionen wurde Gesamt-RNA aus sterilen Seitenblüten der entsprechenden Entwicklungsstadien der konstitutiv *gus*-exprimierenden Linie 9/2/6 (2.1.8) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente entsprechende Gesamt-RNA des Wildtyps Golden Promise.

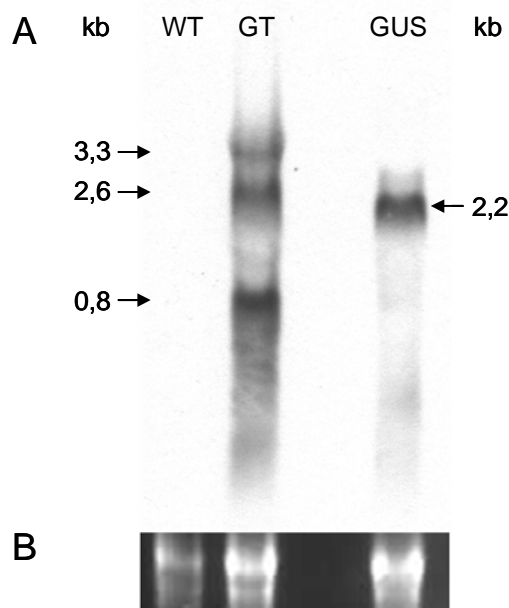


Abb. 18: Northernblotanalyse zum Nachweis von *gus*-Fusionstranskripten

A Für die Northernblotanalyse wurden pro Spur jeweils 33 μ g Gesamt-RNA geladen, die aus sterilen Seitenblüten des Wildtyps Golden Promise (WT), der Linie GTDsB 26/1 (GT) und der konstitutiv *gus*-exprimierenden Linie 9/2/6 (GUS) isoliert wurden. Die Detektion erfolgte mit einem DIG-markierten *gus-antisense* Transkript. **B** Abbildung der zugehörigen Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese als Kontrolle der RNA-Mengen.

In der Northernblotanalyse von RNA aus Seitenblüten der Linie GTDsB 26/1 konnten drei Banden mit einer Größe von 3,3; 2,6 und 0,8 kb detektiert werden (Abb. 18 GT). Das *gus*-Transkript der Kontrolllinie 9/2/6 weist die erwartete Größe von 2,2 kb auf (Abb. 18 GUS). Die Differenz der 3,3 kb- und 2,6 kb-großen Transkripte der Linie GTDsB 26/1 zum *gus*-Transkript beträgt ca. 1,1 und 0,4 kb. Dieser Größenunterschied indiziert eine transkriptionale Fusion von *gus*-Transkripten mit unbekanntem Sequenzen.

3.5.5 Analyse der 5'terminalen Fusionen von *gus*-Fusionstranskripten

Um Informationen über die unbekannt Sequenz im 5'Ende des *gus*-Fusionstranskripts zu bekommen ist die 5'RACE eine geeignete Methode. Die 5'RACE ermöglicht ausgehend von einer bekannten Sequenz im Transkript die Amplifikation von unbekannt Sequenzen im 5'Ende des Transkripts. Die notwendige zweite Primerbindestelle wird durch das Anhängen eines homopolymeren Schwanzes an das 5'Ende der cDNA des *gus*-Transkripts generiert. Für dieses sogenannte *tailing* werden präferentiell poly(dA) oder poly(dG) verwendet. Für beide Methoden sind Vor- und Nachteile bekannt. Die Verwendung eines poly(dA)-Schwanzes zusammen mit einem Primer mit oligo(dT)-Schwanz kann im Hinblick auf den G/C-Reichtum codierender Sequenzen und 5'UTR unspezifische Amplifikationen verringern (Frohman 1993). Ein Vorteil des poly(dG)-*tailing* ist die höhere thermische Energie und dadurch gesteigerte Spezifität, die für die Primer-Bindung angelegt werden kann. Um die Wahrscheinlichkeit der Amplifizierung von Sequenzen der 5'Transkriptenden zu erhöhen, wurden in dieser Arbeit parallel beide Strategien etabliert und angewendet.

3.5.5.1 Amplifizierung von 5'Enden von *gus*-Fusionstranskripten durch 5'RACE mit poly(dG)-*tailing*

Die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA von sterilen Seitenblüten der Linie GTDsB 26/1 erfolgte mit dem *gus*-spezifischen Primer R-GUS-D (2.2.8, Abb. 5). Das *tailing* wurde mit dGTP durchgeführt (2.2.8). Die erste und zweite PCR wurden mit CB3 sowie den *gus*-spezifischen Primern R-GUS-B bzw. R-GUS-A durchgeführt (2.2.8). Die Detektion der 5'RACE-Produkte in einer Southernblotanalyse (2.2.13) erfolgte mit der *gus*-spezifischen Sonde 35bp-GUS-Oligo (2.1.7).

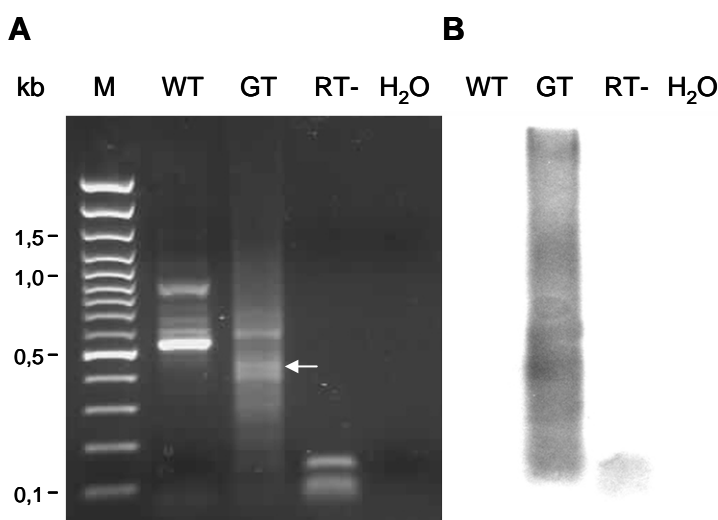


Abb. 19: 5'RACE nach poly(dG)-*tailing*

A Auftrennung der 5'RACE-Produkte im Agarosegel **B** Southernblotanalyse von Gel A, die Detektion erfolgte mit der *gus*-spezifischen 35bp-Oligo-Sonde (2.1.7). **WT** Wildtyp. **GT** Linie GTDsB 26/1. **RT-** Reaktionsansatz mit RNA der Linie GTDsB 26/1 ohne Zugabe von Reverser Transkriptase zum cDNA-Syntheseschritt. **H₂O** Wasserkontrolle. **M** GeneRuler™100bp DNA Ladder Plus. Der weiße Pfeil markiert PCR-Produkte mit einer Größe von ca. 450 bp.

Bei der 5'RACE der Linie GTDsB 26/1 konnten spezifische DNA-Fragmente mit Größen von 100 bp bis über 1 kb amplifiziert werden (Abb. 19 A und B, GT). Im Agarosegel sind Banden von Amplifikaten der Größen 450 und 600 bp erkennbar, welche ebenfalls in der Southernblotanalyse detektiert werden können. Ferner sind in der Southernblotanalyse intensivere Hybridisierungssignale der PCR-Produkte mit Größen von über 1 kb zu erkennen (Abb. 19 B, GT). Im Ansatz mit Gesamt-RNA aus Seitenblüten des Wildtyps Golden Promise wurden mehrere DNA-Fragmente mit Größen von 550 bis 900 bp amplifiziert (Abb. 19 A, GP). Diese hybridisieren nicht mit der 35bp-GUS-Oligosonde, so dass es sich um unspezifische Amplifikate handeln muss.

Eine Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Größen von 1,1 kb, die dem zweiten in der Northernblotanalyse (Abb. 18) nachgewiesenen 5'Transkriptende entsprechen, ist nur in der Southernblotanalyse (Abb. 19 B, GT) deutlich nachweisbar. Für eine Isolierung und Subklonierung dieser DNA-Fragmente wäre eine Steigerung der Menge an Amplifikaten wünschenswert. Deshalb wurden mehrere Modifikationen der Reaktionsbedingungen getestet:

- Reduktion der Primerkonzentration von CB3 und R-GUS-B bzw. R-GUS-A von 0,2 pmol/μl auf 0,05 pmol/μl,
- Variation der cDNA-Menge, die in die 5'RACE als Matrize eingesetzt wurde,
- Isolierung der Amplifikate mit Größen von 1,0 bis 1,5 kb und deren Einsatz in eine geschachtelte PCR mit den Primern CB3 und R-GUS-A.

Alle drei getesteten Modifikationen der Reaktionsbedingungen haben nicht zu der Amplifikation einer im Agarosegel deutlich sichtbaren Bande mit einer Größe von 1,1 kb geführt.

Es konnten DNA-Fragmente von 450 bp, die in ihrer Größe dem 0,4 kb-großen, in der Northernblotanalyse (Abb. 18) nachgewiesenen 5'Transkriptende entsprechen, amplifiziert werden (Abb. 19 A, GT). Diese wurden subkloniert (2.2.15) und anschließend sequenziert (2.1.11).

3.5.5.2 Sequenzanalyse der amplifizierten 5'Transkriptenden

Es konnten insgesamt 14 mit dem *gus*-Transkript fusionierte DNA-Fragmente isoliert werden. Aufgrund ihrer Sequenz wurden sie in fünf verschiedene Typen, Sequenz 1 bis 5, eingeteilt (Abb. 20). Es konnten 5'Enden von *gus*-Fusionstranskripten mit Längen von 191 bis 387 bp isoliert werden. Die Länge bezieht sich dabei auf das isolierte 5'Ende bis zur Spleißstelle des GTDsB-Konstrukts bzw. im Fall von Sequenz 5 bis zur Sequenz von *gus*. Die längsten Sequenzen entsprechen somit der in der Northernblotanalyse (Abb. 18) nachgewiesenen, 5'terminalen Fusionssequenz von 0,4 kb. In 13 der 14 Sequenzen sind unterschiedliche Teile des Vektors pBluescript mit den Spleißakzeptorstellen A1 oder A2 des GTDsB-Konstrukts verspleißt. Die GTDsB-Parentallinien waren mit dem Vektor pGTDsB transformiert worden (2.1.8.2). Dieser 6483 bp-lange Transformationsvektor besteht aus dem Vektor pBluescriptSK mit einer Insertion des 3456 bp-langen GTDsB-Konstrukts von Position 716 bis 4180. In den Sequenzen der isolierten DNA-Fragmente sind Sequenzen von pBluescript zehnmal über die

Spleißakzeptorstelle A1 und dreimal über A2 mit dem *gus*-Reporter verspleißt. In den Sequenztypen 1 bis 4 sind die Sequenzen des pBluescript-Transformationsvektors immer exakt an der Position 5918 mit den Spleißakzeptorstellen des GTDsB-Konstrukts verspleißt (Abb. 20, Sequenz 1-4). Die Sequenztypen 1 und 3 sind jeweils aus zwei verschiedenen Teilen von pBluescript zusammengesetzt, was auf weitere Spleißvorgänge innerhalb pBluescript hinweist (Abb. 20, Sequenz 1 und 3). In der Sequenz 5 sind 387 bp des pBluescript-Vektors direkt mit der codierenden Sequenz von *gus* verknüpft (Abb. 20, Sequenz 5). Die Spleißakzeptorstellen sowie die ersten 87 bp von *gus* fehlen.

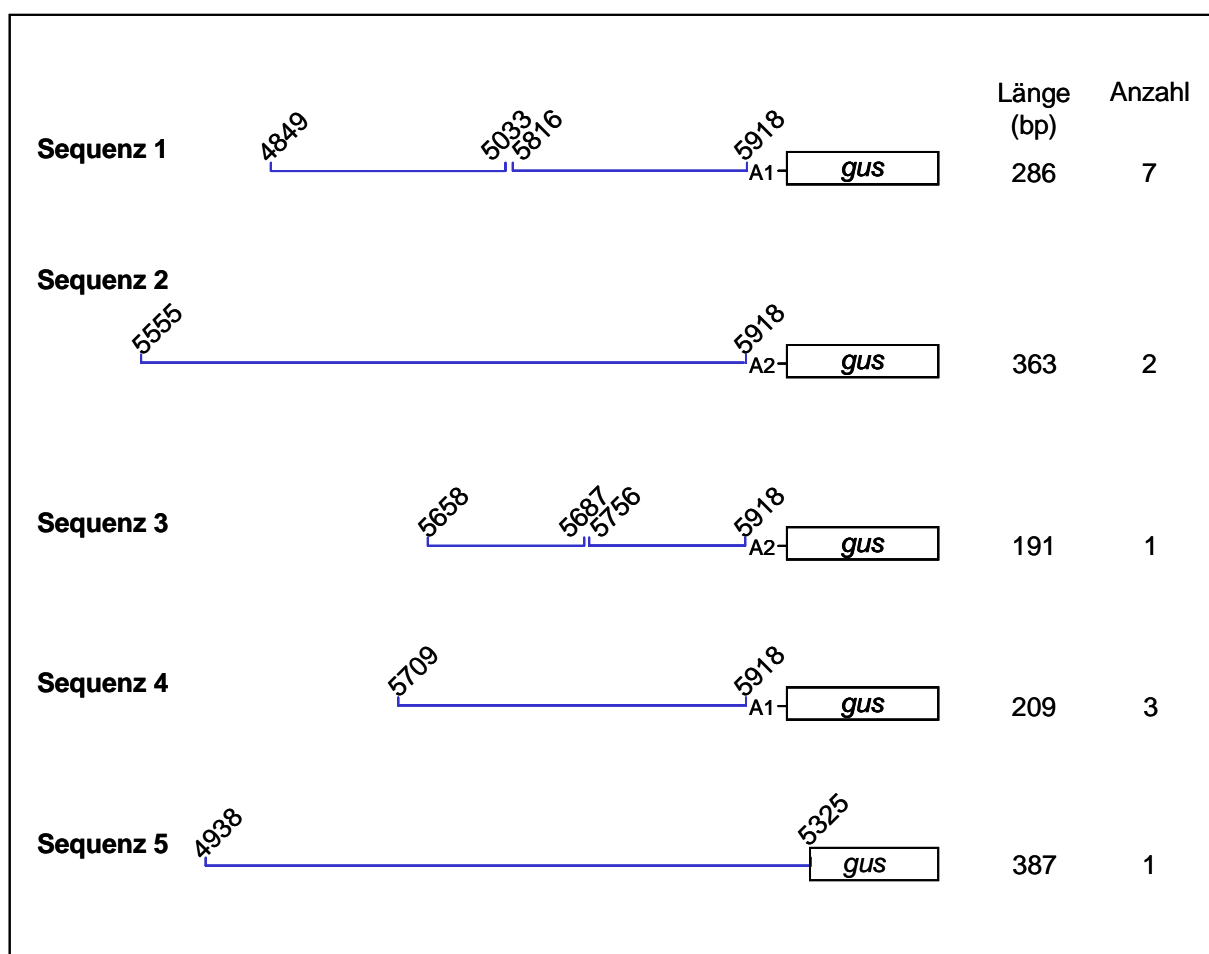


Abb. 20: Schematische Darstellung der von amplifizierten 5' Transkriptenden generierten Sequenzen

Bei den Sequenzen 1-5 handelt es sich um mit Sequenzen des *gus*-Transkripts (Box) verspleißten Sequenzen des Vektors pBluescript (blaue Linien). Die schräggestellten Zahlen beziehen sich auf die Basenpositionen im insgesamt 6483 bp-langen pGTDsB-Transformationsvektor (2.1.6), welcher aus pBluescript mit einer Insertion des GTDsB-Konstrukts besteht. Die jeweils benutzte Spleißakzeptorstelle A1 oder A2 ist angegeben. In bp angegeben ist die Länge der isolierten 5' Transkriptenden bis zur Spleißakzeptorstelle bzw. zur *gus*-Sequenz (Sequenz 5). Die Anzahl der vom jeweiligen Typ isolierten DNA-Fragmente ist angegeben.

Es wurden zusätzlich zwei DNA-Fragmente isoliert, deren Sequenzen keine Übereinstimmung (2.1.10) mit den Sequenzen des GTDsB-Konstrukts oder dem pBluescript-Vektor zeigen. Beide Sequenzen sind identisch und zeigen eine sehr hohe Identität mit der Sequenz der 28S ribosomalen RNA aus Weizen (*Triticum aestivum* L., Accession number AY04941.1). Bei beiden erfolgte die unspezifische Amplifikation durch

die Bindung des Primers CB3. Diese unspezifische Bindung ist eine Erklärung für die Amplifikationen in der Negativkontrolle mit Gesamt-RNA des Wildtyps Golden Promise (Abb.19 A, GP). Erwartungsgemäß konnten diese Amplifikate in der Southernblotanalyse mit der *gus*-spezifischen Oligo-Sonde nicht detektiert werden (Abb.19 B, GP).

3.5.5.3 Amplifizierung der 5'Enden von *gus*-Fusionstranskripten durch 5'RACE mit poly(dA)-tailing

Parallel zur Durchführung der 5'RACE mit poly(dG)-tailing wurden Experimente zur 5'RACE mit poly(dA)-tailing vorgenommen. Da zum Zeitpunkt dieser Experimente bereits 5'Transkriptsequenzen vorlagen, deren Größen der in der Northernblotanalyse (Abb. 18) nachgewiesenen 400 bp-großen 5'terminalen Fusion entsprechen (Abb. 20), wurde in diesen Analysen der spezielle Fokus auf das 1,1 kb-Fragment gelegt. Für die Verfolgung dieser zweiten Strategie wurden die beiden Primer T5 und T6 entworfen. Der Primer T5 enthält eine zufällige Nukleotidsequenz von 35 bp und einen oligo(dT)-Schwanz von 17 Nukleotiden (2.1.6). Der Primer T6 bindet in der zufälligen Nukleotidsequenz von T5.

Für die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA von Seitenblüten der Linie GTDsB 26/1 wurde neben R-GUS-D der *gus*-spezifische Primer R-GUS-3 verwendet (Abb. 5). Die homopolymere tailing-Reaktion erfolgte mit dATP. Die anschließende Amplifikation erfolgte mit T5 und dem *gus*-spezifischen Primer R-GUS-C oder R-GUS-T7 (2.2.8). In der PCR2 wurden T6 und als geschachtelte *gus*-spezifische Primer R-GUS-T3 und R-GUS-2 eingesetzt (2.2.8). Die Detektion spezifischer 5'RACE-Produkte in einer Southernblotanalyse (2.2.13) erfolgte mit der 35bp-GUS-Oligosonde (2.1.7).

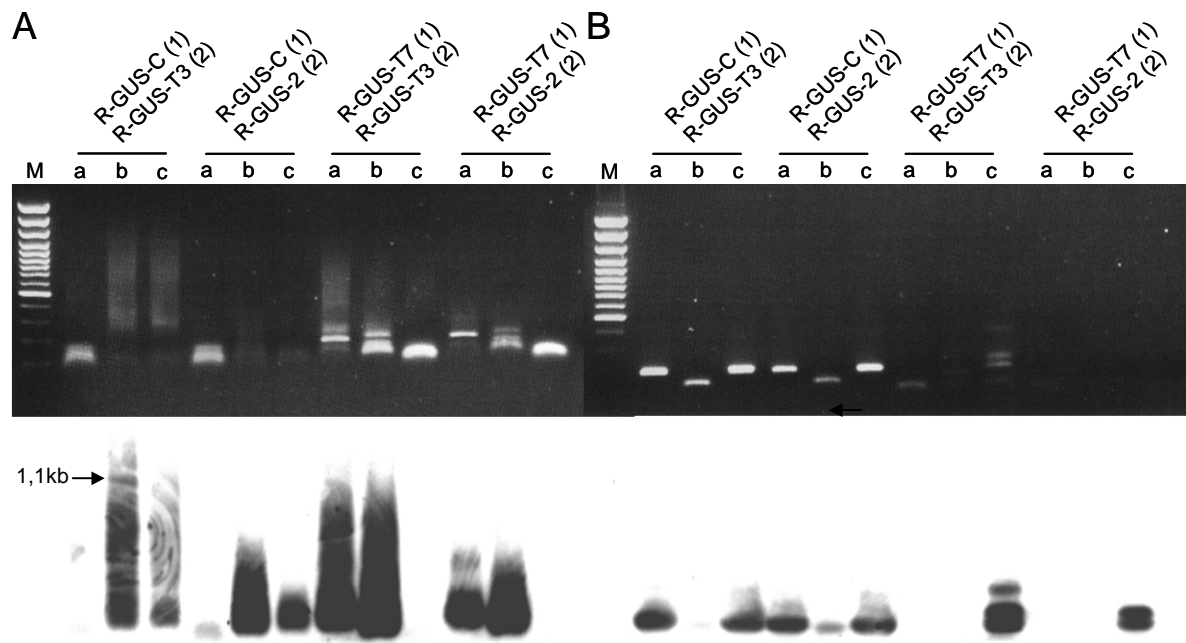


Abb. 21: 5'RACE mit poly(dA)-tailing und verschiedenen Primerkombinationen

Die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA der Linie GTDsB 26/1 wurde mit den Primern R-GUS-3 (A) und R-GUS-D (B) durchgeführt. Es wurden nach der *tailing*-Reaktion mit dATP jeweils drei unterschiedliche Mengen an cDNA (0,5µl, 0,25µl, 0,1µl, a-c) in die 5'RACE eingesetzt. Die für die PCR1 (1) und PCR2 (2) verwendeten Primer sind jeweils angegeben. Die Detektion in der Southernblotanalyse (unten) erfolgte mit der *gus*-spezifischen 35bp-GUS-Oligonsonde (2.1.7). Der Marker (M) ist GeneRuler™100bp DNA Ladder Plus. Mit einem Pfeil markiert ist die 1,1 kb-große Bande aus einem Ansatz mit 0,25 µl R-GUS-3-amplifizierter cDNA, R-GUS-C und R-GUS-T3.

Es ist eine deutliche Differenz zwischen der cDNA-Synthese mit R-GUS-3 und R-GUS-D zu erkennen. In der 5'RACE mit R-GUS-D generierter cDNA erfolgte nur eine Amplifikation von Fragmenten unter 500 bp (Abb. 21 B). Im Gegensatz dazu konnten in den Ansätzen mit R-GUS-3 mit den Primerkombinationen R-GUS-C/R-GUS-T3 und R-GUS-T7/R-GUS-T3 DNA-Fragmente mit Größen von über 1 kb amplifiziert werden (Abb. 21 A). In der Southernblotanalyse konnte zudem für den Ansatz mit 0,25 µl R-GUS-3-amplifizierter cDNA und den Primern R-GUS-C und R-GUS-T3 eine Bande bei 1,1 kb detektiert werden (Abb. 21 A, unten), was der aus der Northernblotanalyse (Abb. 18) erwarteten Größe des größeren der beiden Transkripte entspricht. Im Agarosegel ist das 1,1 kb-große Amplifikat nicht als Bande zu erkennen (Abb. 21 A). Daher wurde der Versuch unternommen, das DNA-Fragment durch die Isolierung der mit R-GUS-C und R-GUS-T3 amplifizierten DNA-Fragmente mit Größen von 1,2 bis 1,5 kb mit Reco-chips (2.1.3) aus dem Agarosegel anzureichern und zu subklonieren (2.2.15). Die entsprechend dem in Abb. 21 dargestellten Ansatz durchgeführte 5'RACE (2.2.8) ist in Abb. 22 gezeigt. In der Kolonie-PCR (2.2.9) von 78 Klonen mit den Primern T6 und R-GUS-T3 (2.1.6) konnten allerdings nur DNA-Fragmente mit Größen bis 400 bp amplifiziert werden.

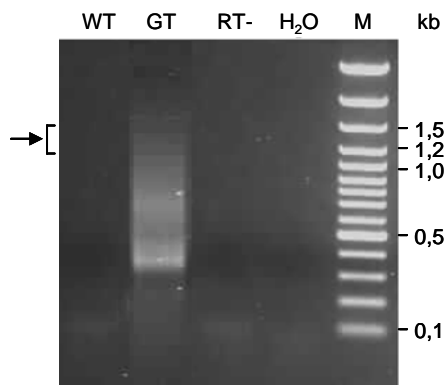


Abb. 22: 5'RACE zur Isolierung von PCR-Produkten mit Größen von 1,2 bis 1,5 kb

Entsprechend dem in Abb. 21 dargestellten Ansatz wurde für die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA steriler Seitenblüten der Linie GTDsB 26/1 R-GUS-3 eingesetzt. Die Amplifikation nach *tailing* mit dATP erfolgte mit T5 und R-GUS-C. Für die PCR2 wurden T6 und R-GUS-T3 verwendet (2.2.8). **GT** transgene Linie GTDsB 26/1 **RT-** Reaktionsansatz mit Gesamt-RNA der Linie GTDsB 26/1 ohne Zugabe von Reverser Transkriptase zum cDNA-Syntheseschritt **GP** Ansatz mit Golden Promise Wildtyp-Gesamt-RNA aus Seitenblüten. **M** GeneRuler™100bp DNA Ladder Plus. Die aus dem Agarosegel isolierte DNA-Fraktion ist mit einem Pfeil markiert.

3.5.5.4 Sequenzanalyse der durch 5'RACE mit poly(dA)-*tailing* amplifizierten 5'Transkriptenden

Die Sequenzierung von 9 Klonen hat gezeigt, dass nur in einem der klonierten DNA-Fragmente das 5'Ende von *gus* und die drei Spleißakzeptorstellen des GTDs_B-Konstrukts vollständig enthalten sind. In dieser Sequenz befinden sich vor einer 80 bp-langen Adenin-Basenfolge sieben Basen des Transformationsvektors pBluescript (Abb. 23 A). Wie schon bei den mit der 5'RACE nach poly(dG)-*tailing* isolierten Sequenzen (Abb. 20, Sequenz 1-4) ist der pBluescript-Vektor exakt an Position 5918 mit der Spleißakzeptorstelle A1 des GTDs_B-Konstrukts verspleißt. Die Inserts aller neun Klone enthalten einen sehr lange Adenin-Basenfolge von 49 bis 116 Basen. In acht der neun Sequenzen fehlen bis zu 62 Basen vom 5'Ende der Sequenz des *gus*-Reporters. (Abb. 23 B).

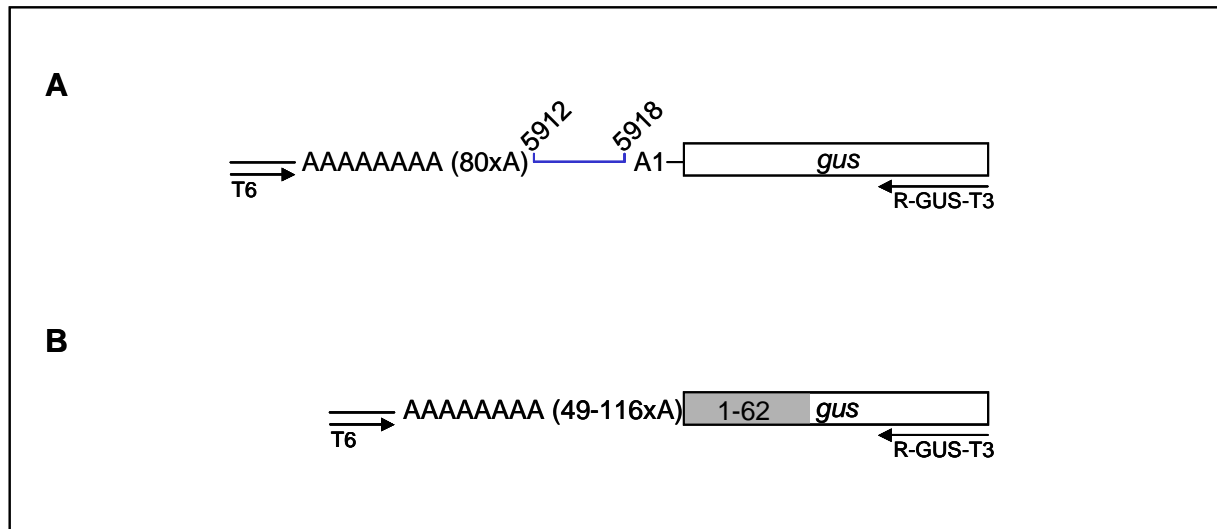


Abb. 23: Schematische Darstellung der Sequenzen amplifizierter 5'Transkriptenden

A Schematische Darstellung der Sequenz mit intaktem 5' Ende von *gus* und erhaltenen Spleißakzeptorstellen (A1) des GTDsB-Konstrukts. Die schräggestellten Zahlen beziehen sich auf die Basenpositionen im insgesamt 6483 bp-langen pGTDsB-Transformationsvektor (2.1.6), welcher aus pBluescript mit einer Insertion des GTDsB-Konstrukts besteht. **B** Schematische Darstellung der acht isolierten Sequenzen mit Deletionen von 1 bis 62 Basen im 5' Ende der codierenden Sequenz von *gus* (grau). Die Bindestellen der 5'RACE-Primer T6 und R-GUS-T3 sind markiert. In Klammern ist die Gesamtzahl der Adenine (A) angegeben.

Mit der 5'RACE mit poly(dA)-*tailing* wurde aus Gesamt-RNA der Linie GTDsB 26/1 ein spezifisches DNA-Fragment mit einer Größe von 1,1 kb amplifiziert (Abb. 21 A, unten). Es konnte allerdings nur ein einziges DNA-Fragment von 7 Basen isoliert werden, dessen Sequenz einen Hinweis auf ein *gus*-Fusionstranskript liefert (Abb. 23 A). Die Amplifizierung der großen Anzahl frühzeitig bei der cDNA-Synthese abgebrochener Transkripte kann wie folgt erklärt werden. Die Lange Abfolge von Adeninen bis zu 116 Basen indiziert ein sehr effizientes poly(dA)-*tailing*, so dass möglicherweise auch eine sehr große Zahl an abgebrochenen cDNAs als Matrize für die PCR zur Verfügung stand. Es ist vorstellbar, dass diese in den nachfolgenden PCR-Reaktionen besonders effektiv amplifiziert wurden, so dass schließlich in dem 5'RACE-Produkt ein starkes Übermaß an kurzen Amplifikaten vorherrscht. Das würde erklären, warum trotz der Isolierung einer Fraktion von DNA-Fragmenten größer als 1 kb in den 78 untersuchten Klonen kein DNA-Fragment mit einer Größe von über 200 bp isoliert werden konnte.

Für die Amplifizierung und Isolierung der Sequenzen der 5'Enden von *gus*-Fusionstranskripten hat sich somit die Strategie mit dem poly(dG)-*tailing* und dem RACE-Primer CB3 als erfolgreicher erwiesen und wurde daher weiter verfolgt.

3.5.5.5 Amplifizierung und Analyse stromaufwärts im 5'Ende liegender Sequenzen

Um Sequenzen des *gus*-Fusionstranskripts zu isolieren, welche, wie aufgrund der Ergebnisse der Northernblotanalyse (Abb. 18) vermutet wird, sich stromaufwärts der bisher ca. 400 isolierten Basenpaare befinden, wurden ausgehend von der längsten Sequenz 2 (Abb. 20) insgesamt drei geschachtelte Primer pBlue_low1, pBlue_low2 und pBlue_low3 konzipiert. Mit Gesamt-RNA aus sterilen Seitenblüten der Linie GTDsB 26/1 wurde mit pBlue_low1 eine cDNA-Synthese durchgeführt. Das homopolymere *tailing* erfolgte mit dGTP. Die PCR1 und PCR2 wurden entsprechend mit CB3 und pBlue_low2 und pBlue_low3 durchgeführt (2.2.8).

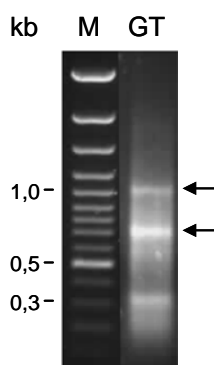


Abb. 24: 5'RACE mit den Primern pBlue_low1, pBlue_low2 und pBlue_low3

Auftrennung der 5'RACE-Produkte im Agarosegel. GT Linie GTDsB 26/1 M GeneRuler™100bp DNA Ladder Plus. Die schwarzen Pfeile markieren isolierte PCR-Produkte.

Auf dem Agarosegel (Abb. 24) lassen sich drei Banden mit Größen von 0,3; 0,8 und 1,1 kb erkennen. Die DNA-Fragmente der 1,1 und 0,8 kb-großen Banden wurden subkloniert (2.2.15). Es konnten drei spezifische DNA-Fragmente isoliert werden. Zwei der Fragmente mit Längen von 790 bp (Abb. 25, Sequenz 2.1) und 737 bp (Abb. 25, Sequenz 2.2) stammen aus der Subklonierung der 1,1 kb-großen Bande. Die Sequenzen zeigen eine Identität zu Sequenzen des pBluescript-Vektors. Das dritte DNA-Fragment stammt aus der Klonierung der 0,8 kb-großen Bande und weist eine mit der des 737 bp-langen Fragments identische, um 4 bp am 5'Ende verkürzte Sequenz auf. Bei der Sequenz 2.1 sind drei Teile des pBluescript-Vektors, Pos. 1244-1316, Pos. 1436-1554 und Pos. 4985-5585 zu einer 790 bp-langen Sequenz verspleißt. Sequenz 2.2 besteht aus einer 737 bzw. 733 bp-langen Sequenz, die der Sequenz von Position 4848 bis 5585 des pBluescript-Vektors entspricht.

Setzt man diese Sequenzen *in silico* mit der bereits isolierten Sequenz 2 (Abb. 20) zusammen, ergibt sich für die Sequenzen 2+2.1 eine Gesamtlänge von 1123 bp. Die Länge der aus Sequenz 2 und 2.2 zusammengesetzten Sequenz beträgt entsprechend 1070 bp. Die Größen dieser zwei Sequenzen entsprechen dem in der Northernblotanalyse (Abb. 18) nachgewiesenen, mit *gus* fusionierten Transkript mit einer Größe von 1,1 kb.

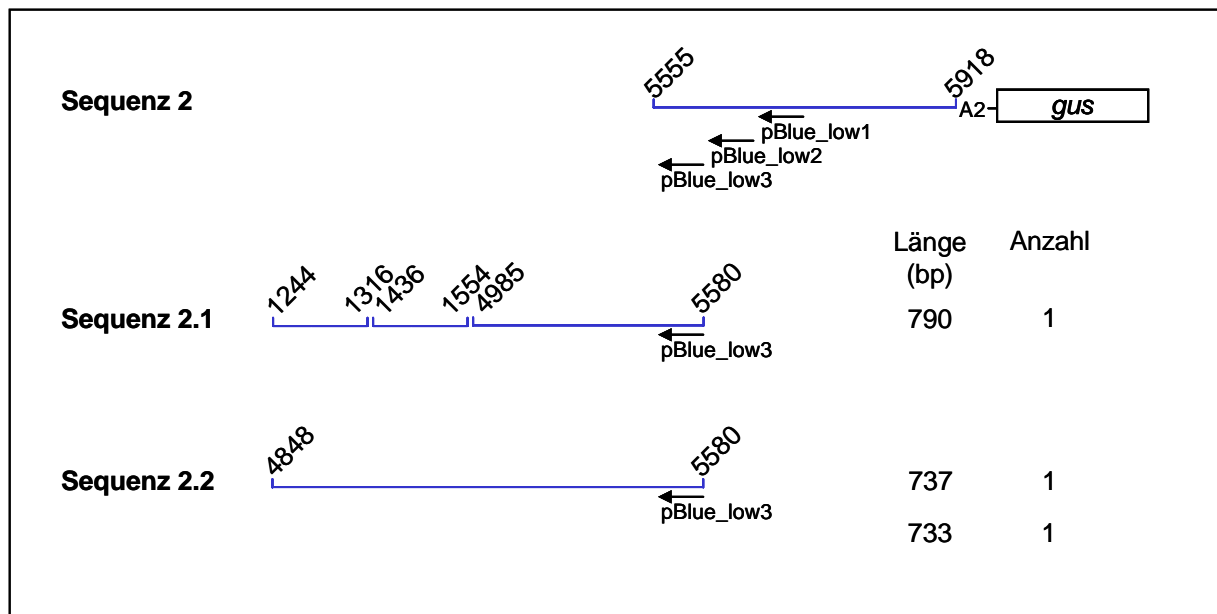


Abb. 25: Schematische Darstellung der Sequenzen von 5' Transkriptenden

Die Sequenzen 2.1 und 2.2 der in der 5'RACE mit den Primern pBlue_low1, pBlue_low2 und pBlue_low3 amplifizierten und isolierten DNA-Fragmente sind dargestellt. Beide Sequenzen zeigen eine Übereinstimmung mit Sequenzen des Transformationsvektors pBluescript (blaue Linie). Die schräggestellten Zahlen beziehen sich auf die Basenpositionen im insgesamt 6483 bp-langen pGTDsB-Transformationsvektor (2.1.6), welcher aus pBluescript mit einer Insertion des GTDsB-Konstrukts besteht. A2 stellt symbolisch die Spleißstelle des GTDsB-Konstrukts dar. In bp ist die Länge der isolierten DNA-Fragmente angegeben. Die Anzahl der isolierten Sequenzen des jeweiligen Typs ist angegeben. Für Sequenz 2.2 konnten zwei DNA-Fragmente isoliert werden, von denen das eine um 4 Basen kürzer ist.

3.5.5.6 Analyse des 5' Endes der Sequenz 2.2

Um zu untersuchen, ob in der Sequenz 2.2 bereits das vollständige Ende des *gus*-Fusionstranskripts repräsentiert ist, wurden drei weitere Primer pBlue_low4, pBlue_low5 und pBlue_low6 konzipiert (2.1.6), die versetzt im 5' Ende der Sequenz 2.2 binden (Abb. 27). Mit diesen Primern wurde mit Gesamt-RNA aus sterilen Seitenblüten der Linie GTDsB 26/1 eine 5'RACE durchgeführt (2.2.8). Die Primerbindestellen wurden so gewählt, dass die Amplifikation eines DNA-Fragments von ca. 300 bp erfolgt, falls bereits das vollständige 5' Ende isoliert wurde.

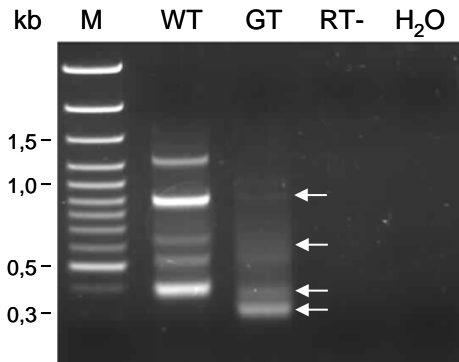


Abb. 26: 5'RACE mit den Primern pBlue_low4, pBlue_low5 und pBlue_low6

Auftrennung der 5'RACE-Produkte im Agarosegel. **WT** Wildtyp **GT** Linie GTDsB 26/1 **RT-** Linie GTDsB 26/1, die cDNA-Synthese erfolgte ohne Zusatz von Reverser Transkriptase. **H₂O** Wasserkontrolle **M** GeneRuler™100bp DNA Ladder Plus. Die weißen Pfeile markieren die vier aus dem Agarosegel isolierten Banden.

In der 5'RACE mit Gesamt-RNA aus Seitenblüten der transgenen Linie GTDsB 26/1 und den Primern pBlue_low4 pBlue_low5 und pBlue_low6 konnte ein Hauptprodukt mit einer Größe von 300 bp amplifiziert werden (Abb. 26 GT). Diese Bande entspricht der erwarteten Größe. Zusätzlich konnten DNA-Fragmente mit Größen von 300 bis 1000 bp amplifiziert werden. Die Amplifikate der Banden mit Größen von 300 bp, 350 bp, 650 bp, 950 bp (Abb. 26, weiße Pfeile) wurden isoliert, subkloniert und anschließend sequenziert. Insgesamt konnten daraus 10 spezifische DNA-Fragmente mit Längen von 175 bis 278 bp isoliert werden. Die Sequenzen der sechs längsten DNA-Fragmente, alle mit Längen von ca. 270 bp, entsprechen alle der Sequenz 2.2. und enden alle innerhalb der gleichen 8 bp der pBluescript-Sequenz (Abb. 27). Das ist ein Hinweis darauf, dass bereits in der Sequenz 2.2 das vollständige 5'Transkriptende repräsentiert ist.

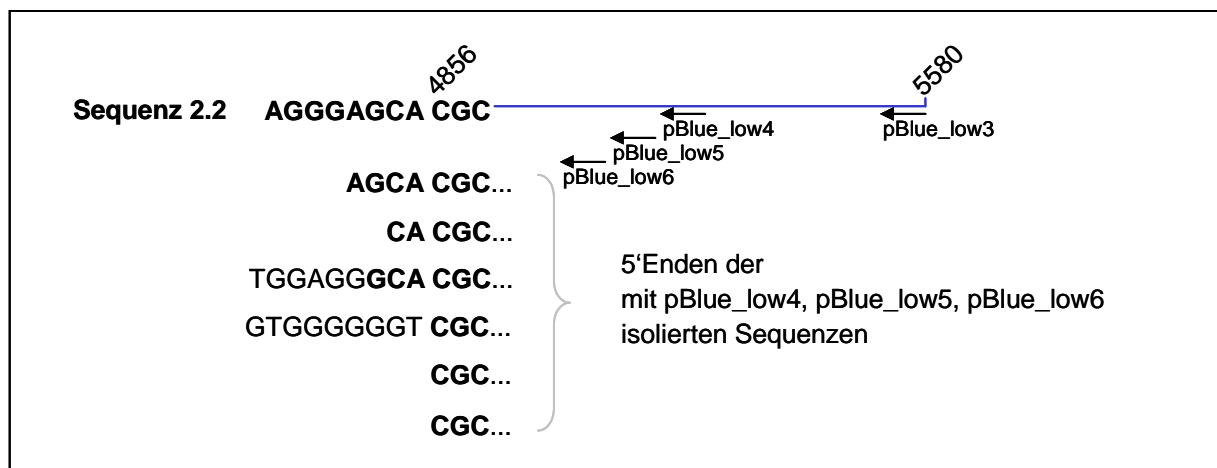


Abb. 27: Schematische Darstellung der äußersten 5'Enden von isolierten Sequenzen

Die Sequenz 2.2 ist schematisch dargestellt. Die Bindestellen der Primer pBlue_low3, pBlue_low4, pBlue_low5 und pBlue_low6 sind angegeben. Die schräggestellten Zahlen beziehen sich auf die Basenpositionen im insgesamt 6483 bp-langen pGTDsB-Transformationsvektor (2.1.6), welcher aus pBluescript mit einer Insertion des GTDsB-Konstrukts besteht. Die Basenfolge am 5'Ende der Sequenz 2.2 sowie der sechs längsten, mit den Primern pBlue_low4, pBlue_low5 und pBlue_low6 amplifizierten DNA-Fragmente ist angegeben. Die mit der Sequenz 2.2 übereinstimmenden Basen sind fett markiert.

Das Cytosin der Position 4856 ist die letzte Base, die in allen Sequenzen gleich ist (Abb. 27). Zwei DNA-Fragmente enthalten am 5'Ende acht bzw. neun weitere Basen, die nicht der Sequenz von pBluescript entsprechen. Der hohe Anteil an Guanin lässt vermuten, dass es sich um Artefakte der *tailing*-Methode handelt. Aus der Literatur ist zudem bekannt, dass Reverse Transkriptasen im 5'Ende einige Matrizen-unabhängige Nukleotide einfügen können (Frohman 1993). Die restlichen DNA-Fragmente enthalten alle Basen, die der pBluescript-Sequenz und somit der Sequenz 2.2 entsprechen.

Die Isolierung von insgesamt sieben Sequenzen, die in dem Bereich von 8 bp 5' von Position 4856 im GTDsB-Vektor enden (Abb. 27), sowie das Auftreten von Basenpaaren, die nicht der nativen Sequenz des pBluescript-Vektors entsprechen, indizieren, dass in der Sequenz 2.2 das vollständige 5'Ende isoliert wurde.

3.5.6 Nachweis von *in silico* zusammengesetzten Sequenzen

Die Existenz der *in silico* aus den Ergebnissen zweier 5'RACE-Experimente zusammengesetzten Sequenzen 2+2.1 bzw. 2+2.2 (Abb. 25) mit Längen von 1123 bzw. 1070 bp muss verifiziert werden. Dafür wurden die Primerpaare trans1_up und trans1_low sowie trans2_up und trans2_low entworfen (2.1.6). Sie binden jeweils im 5'Transkriptende bzw. im 5'Ende von *gus*. Nach der cDNA-Synthese mit Gesamt-RNA aus sterilen Seitenblüten der Linie GTDsB 26/1 mit R-GUS-3 wurde mit den Primern trans1_up und trans1_low und trans2_up und trans2_low eine RT-PCR durchgeführt (2.2.7.2).

Mit den Primern trans1_up und trans1_low, die in der Sequenz 2+2.1 und im 5'Ende von GUS binden, konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden. Zwei Erklärungen sind denkbar. Zum einen kann es sein, dass das isolierte Transkript nicht existiert. Zum anderen ist es möglich, dass das Transkript in der isolierten Gesamt-RNA in einer sehr geringen Konzentration vorliegt, so dass mit der angewendeten Methode keine Amplifikation möglich war.

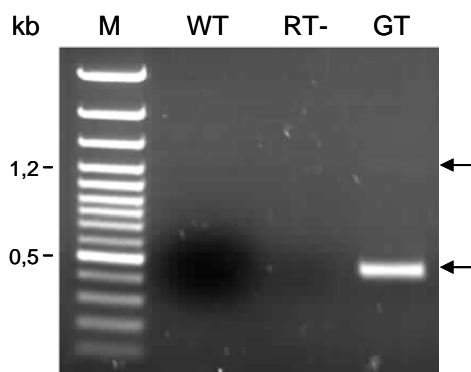


Abb. 28: RT-PCR zur Verifizierung des aus Sequenz 2+2.2 zusammengesetzten Transkripts

Auftrennung der RT-PCR-Produkte im Agarosegel. **WT** Wildtyp **GT** Linie GTDsB 26/1 **RT-** Reaktionsansatz mit Gesamt-RNA der Linie GTDsB 26/1 ohne Zugabe von Reverser Transkriptase zum cDNA-Syntheseschritt **M** GeneRuler™100bp DNA Ladder Plus. Die schwarzen Pfeile markieren die aus dem Agarosegel isolierten Banden.

In der RT-PCR der Linie GTDsB 26/1 konnten mit den Primern trans2_up und trans2_low DNA-Fragmente mit Größen von 450 bp und 1,2 kb amplifiziert werden (Abb. 28, GT). Die Bande bei 1,2 kb ist sehr schwach. Die 0,45 kb-Bande wurde in der RT-PCR im Vergleich zum 1,2 kb-Fragment sehr viel stärker amplifiziert. Die PCR-Produkte beider Banden wurden isoliert und sequenziert. Die Sequenz des 1,2 kb-langen PCR-Produkts entspricht exakt der *in silico* aus Sequenz 2 (Abb. 20) und Sequenz 2.2 (Abb. 25) zusammengesetzten Sequenz. Allerdings ist im Gegensatz zu den zwei bereits isolierten Sequenzen 2 (Abb. 20) in den vier isolierten Sequenzen, die aus vier verschiedenen Klonen stammen, der pBluescript-Vektor über A1 mit dem *gus*-Transkript verspleißt. Die Sequenz des 450 bp-Fragments entspricht der isolierten Sequenz 1 (Abb. 20).

Zwei mit der 5'RACE isolierte Sequenzen von *gus*-Fusionstranskripten konnten somit mittels einer RT-PCR verifiziert werden. Sie weisen Längen von 1,1 und 0,3 kb auf (Abb. 29). Die Sequenz des Transkripts 2 entspricht dabei der Sequenz des Transkripts 1 bis auf 784 bp, die deletiert sind. Das indiziert einen weiteren Spleißvorgang innerhalb der Sequenz des pBluescript-Vektors.

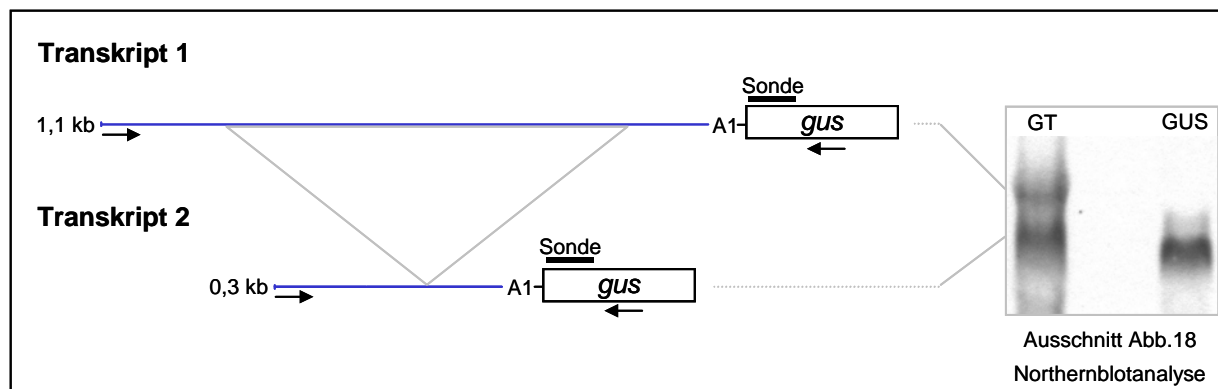


Abb. 29: Schematische Darstellung der Sequenzen von *gus*-Fusionstranskripten aus Blüten der Linie GTDsB 26/1

Schematisch dargestellt sind die beiden isolierten und verifizierten *gus*-Fusionstranskripte mit Größen von 1,1 und 0,3 kb. In beiden Transkripten sind Sequenzen des Transformationsvektors pBluescript (blaue Linie) an das 5' Ende von *gus* (Box) fusioniert. Die Bindestellen, der für die Verifizierung beider Transkripte eingesetzten Primer trans2_up und trans2_low, sind durch Pfeile symbolisiert. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der in Abb. 18 gezeigten Northernblotanalyse. Das graue Dreieck symbolisiert die Deletion von 784 bp im Transkript 2. Die Bindestelle der *gus*-spezifischen Sonde ist markiert.

Wie in Abb. 29 schematisch angedeutet, entsprechen die Größen der beiden isolierten Sequenzen Transkript 1 und 2 denen aus der Northernblotanalyse erwarteten Größen von 1,1 und 0,4 kb (Abb. 18). Es haben sich aus der Isolierung der Sequenzen von *gus*-Fusionstranskripten mit der sensitiven 5'RACE-Technologie Hinweise dafür ergeben, dass die Population an *gus*-Fusionstranskripten in den Seitenblüten der Linie GTDsB26/1 sehr heterogen ist (Abb. 20, Abb. 25). In Anbetracht der Ergebnisse muss angenommen werden, dass in den Seitenblüten weitere *gus*-Fusionstranskripte mit von Transkript 1 und Transkript 2 abweichenden Sequenzen vorhanden sind.

3.5.7 Nachweis der *gus*-Fusionstranskripte in verschiedenen Geweben

Nach der erfolgreichen Isolierung von zwei *gus*-Fusionstranskripten aus der Gesamt-RNA steriler Seitenblüten der Linie GTDsB 26/1 stellt sich folgende Frage: Sind die Transkripte 1 und 2 an der GUS-Expression in den Blüten beteiligt?

Um erste Informationen darüber zu bekommen, wurde eine RT-PCR zum Nachweis der *gus*-Fusionstranskripte mit Gesamt-RNA aus Blatt, Nodium, Spelzen, Stempel und Staubblättern und sterilen Seitenblüten der Entwicklungsstadien 47, 49 und 65-69 nach Zadoks (Chang *et al.* 1974) entsprechend dem unter 3.5.3 beschriebenen Ansatz durchgeführt. Abweichend davon wurden die Primer *trans2_up* und *trans2_low* eingesetzt (2.2.7.1). Es wird, aufgrund der Ergebnisse der RT-PCR zur Verifizierung der zusammengesetzten Transkripte (Abb. 28), mit einer präferentiellen Amplifikation des kürzeren, 450 bp-langen Fragments gerechnet.

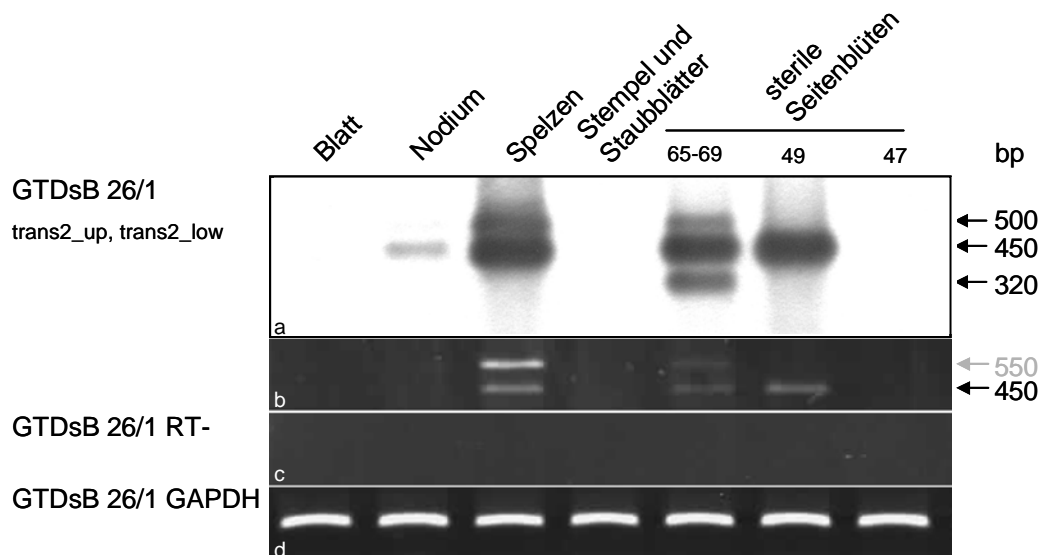


Abb. 30: RT-PCR mit Gesamt-RNA verschiedener Gewebe der Linie GTDsB 26/1

Das jeweilige Gewebe aus dem Gesamt-RNA isoliert wurde ist angegeben. Von den Seitenblüten wurde Gesamt-RNA von den drei verschiedenen Entwicklungsstadien 47, 49 und 65-69 nach Zadoks (Chang *et al.* 1974) isoliert. Gezeigt ist die Amplifikation von cDNAs der Linie GTDsB 26/1 mit den Primern *trans2_up* und *trans2_low* (b) sowie mit GAPDH-spezifischen Primern (d). GTDsB 26/1 RT- ist der Reaktionsansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase zum cDNA-Syntheseschritt (c). Die Produkte aus der Amplifikation mit *trans2_up* und *trans2_low* wurden in einer Southernblotanalyse mit der *gus*-spezifischen 35bp-Oligo-Sonde (2.1.7) detektiert (a). Die Größen der Banden sind in bp angegeben.

Das erwartete 450 bp-Fragment konnte in Nodien, Spelzen und den beiden älteren Stadien der Seitenblüten detektiert werden (Abb. 30 a und b). In den Nodien war die Amplifikation sehr schwach und konnte nur in der sensitiveren Southernblotanalyse detektiert werden (Abb. 30 a). In den Ansätzen mit RNA aus Blatt, Stempel und Staubblättern und sterilen Seitenblüten des Entwicklungsstadiums 47 fand keine Amplifikation statt. Im Agarosegel tritt in den Spelzen und Seitenblüten des Entwicklungsstadiums 65-69 zusätzlich ein unspezifisches Amplifikat mit einer Größe von 550 bp auf, welches von der *gus*-spezifischen Oligosonde 35bp-GUS nicht gebunden wird (Abb. 30 a und b). In der Southernblotanalyse

konnte in den Nodien, Spelzen sowie Seitenblüten der Entwicklungsstadien 65-69 und 49 ein weiteres spezifisches PCR-Produkt mit einer Größe von 500 bp nachgewiesen werden (Abb. 30 a). Es kann sich dabei um ein Fragment, welches durch einen alternativen Spleißvorgang des pBluescript-Vektors entstanden ist, handeln. Das gleiche kann für das exklusiv in den Seitenblüten des Entwicklungsstadiums 65-69 amplifizierte, 320 bp-große PCR-Produkt gelten. Das 1,1 kb-Fragment (Transkript 1, Abb. 29) konnte wie erwartet in keinem der Ansätze amplifiziert werden. Das Transkript 2 konnte in den Entwicklungsstadien 49 und 65-69 der sterilen Seitenblüten der Linie GTDsB detektiert werden. Es handelt sich dabei um die Entwicklungsstadien in denen histochemisch GUS-Expression detektiert werden konnte (Abb.16). Das ist ein erster Hinweis darauf, dass das *gus*-Fusionstranskript 2 zur GUS-Expression in den Blüten der Linie GTDsB 26/1 beiträgt.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von *gene trap*(GT)-Linien und die Erarbeitung von Erkenntnissen zu der Einsetzbarkeit dieser für die funktionelle Genomanalyse von Gerste. Zur Etablierung der GT-Linien im Rahmen eines Zweikomponenten-Systems (Abb. 4) standen Transposase-exprimierende Linien (2.1.8.1) und GTDsB-Linien (2.1.8.2) zur Verfügung, die gekreuzt wurden. Dabei fand das für Monokotyledonen optimierte *gene trap*-Konstrukt GTDsB erstmalig einen Einsatz (Bergmann und Lütticke 2004). Diese GT-Linien waren die Basis zur Bearbeitung von Fragestellungen, deren Beantwortung zum effizienten Einsatz der Linien in einem *gene trap*-System beiträgt.

Ein *gene trap*-Ansatz zeichnet sich dadurch aus, dass er die Identifizierung von Genen, die mit klassischer Insertionsmutagenese nicht zugänglich sind ermöglicht. Aufgrund ihrer strukturellen Merkmale (Abb. 1) können *gene trap*-Konstrukte nach ihrer Insertion einen Marker für das Expressionsmuster des unbekanntes Gens generieren, so dass ein sichtbarer mutanter Phänotyp für die Zuordnung der Funktion des Genprodukts zur Gensequenz nicht erforderlich ist. Die Möglichkeit der fusionalen Transkription des Reportergens mit endogenen genomischen Sequenzen erlaubt einen direkten Zugang zu der Gensequenz über geeignete molekulare Techniken.

Gerste ist eine wirtschaftlich bedeutende Nutzpflanze und findet zudem, insbesondere für die polyploiden Mitglieder der Triticeae, einen Einsatz als Modellorganismus (Cooper *et al.* 2004). Für Gerste existieren viele Werkzeuge der modernen Molekularbiologie (1, S. 9), was sie zu einem sehr geeigneten Objekt für Genomanalysen macht. Das diploide Genom der Gerste ist mit seinen 4873 Mbp ca. 40 Mal größer als das Genom von *Arabidopsis* (Armuganathan und Earle 1991). Die Vergrößerung der Genome von Getreiden beruht auf einer Vergrößerung nicht-kodierender Bereiche (Feuillet und Keller 2002, zur Übersicht). Die geringe Gendichte macht einen Transposon-basierten *gene trap*-Ansatz in Gerste sinnvoll, da für *Ac/Ds*-Elemente in mehreren Studien in heterologen Systemen (Parinov *et al.* 1999, Ito *et al.* 2002, Enoki *et al.* 1999, Greco *et al.* 2001, Kolesnik *et al.* 2004) inklusive Gerste (Koprek *et al.* 2000, Cooper *et al.* 2004) die präferentielle Insertion in putative Gensequenzen dokumentiert wurde.

Für den *gene trap*-Ansatz in Gerste sind folgende Fragen relevant:

1. Transponiert das *gene trap*-Konstrukt GTDsB in den GT-Linien und mit welcher Frequenz finden unabhängige Transpositionen statt, die vererbt werden?
2. Sind bestimmte GT-Linien aufgrund von hohen germinalen Transpositionsfrequenzen für ein *gene trap*-System besonders geeignet?
3. Bleibt die Transpositionsaktivität von GTDsB über mehrere Generationen erhalten?
4. Transponiert GTDsB präferentiell in codierende Genombereiche der Gerste?
5. Erfolgt eine Expression des Reportergens in der GT-Population und wie ist diese Frequenz im Vergleich zu anderen *gene trap*-Systemen?
6. Ist eine effiziente Isolierung der 5'terminal an das *gus*-Transkript fusionierten Sequenzen möglich?

In dieser Arbeit wurden Erkenntnisse zu den Fragestellungen 1, 2, 5 und 6 erarbeitet. Ergebnisse zu den Fragestellungen 2 und 3 lagen aus parallel laufenden Arbeiten vor und wurden zur Vervollständigung des Gesamtbildes in Kapitel 4.5 dargestellt.

4.1 Frequenz und Zeitpunkt der Transposition von GTDsB

Die Faktoren, die den entscheidenden Einfluss auf die Frequenz und den Zeitpunkt der Transposition haben sind zum einen die Transposase und zum anderen die Position der mobilen *gene trap*-Konstrukte im Genom.

Um die Transpositionsfrequenz von GTDsB in dem Zweikomponentensystem zu evaluieren wurden die F1- und F2-Generation der *gene trap*(GT)-Population in Southernblotanalysen untersucht. In 9 von 79 getesteten Pflanzen (11%) der GT-F1-Generation konnten Transpositionen des GTDsB-Konstrukts detektiert werden (Tab. 6). In Gerste wurde bisher für die Transposition von nicht-autonomen *Ds*-Elementen in der F1-Generation eine Frequenz von 2% (Koprek *et al.* 2000) und für autonome *Ac*-Elemente von 1,5% gezeigt (Scholz *et al.* 2001). Für das nicht-autonome *gene trap*-Konstrukt GTDsA konnte in Gerste eine Transpositionsfrequenz in der F1-Generation von 2,4% nachgewiesen werden (Bergmann 2003), wobei mit 28 die Anzahl analysierter Pflanzen klein war. In den Southernblotanalysen der GT-F2-Generation konnten in 49 der 191 getesteten Pflanzen unabhängige Transpositionen des GTDsB-Konstrukts detektiert werden (Tab. 6), was einer Frequenz von 26% entspricht. Die Transpositionsfrequenz von GTDsB ist im Vergleich zu den bisher für die Transpositionsfrequenzen von *Ac/Ds*-Elementen in Gerste publizierten Daten von 1-2% in der F1-Generation (Koprek *et al.* 2000, Scholz *et al.* 2001) und 16% in der F2-Generation (Koprek *et al.* 2000) in diesem System erhöht. Das in der GT-F2-Generation eine höhere Transpositionsfrequenz als in der GT-F1-Generation detektiert werden konnte, begründet sich darin, dass in den Analysen der GT-F2-Generation Transpositionen, die in der GT-F1-Generation und der GT-F2-Generation stattgefunden haben detektiert werden können. Die Transpositionsfrequenz von 26% in der GT-F2-Population ist auch mit den bisher in dem monokotylen System Reis gezeigten vergleichbar. In der Studie von Greco *et al.* (2001) zur Transposition von autonomen *Ac*-Elementen in Reis wurde in den Nachkommen von drei unabhängigen Primärregeneraten eine Transpositionsfrequenz von 33% festgestellt. Kolesnik *et al.* (2004) konnten in ihrem *Ac*-basierten *gene trap*-System in eine germinale Transpositionsfrequenz von 51% in der F2-Generation feststellen. In einer anderen Studie wurde eine mittlere Transpositionsfrequenz für *Ac* von 18,4% berichtet (Enoki *et al.* 1999).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Transposition von GTDsB in der GT-F2-Population zeigen, dass die Transpositionsaktivität von GTDsB in den Nachkommen unabhängiger GTDsB-Parentallinien stark variiert. Auch in anderen Untersuchungen konnte eine Varianz der Transpositionsfrequenzen in unabhängigen Linien beobachtet werden. Koprek *et al.* (2000) konnten in ihrem Zweikomponentensystem in Gerste für nicht-autonome *Ds*-Elemente in der F2-Generation variable Transpositionsfrequenzen von 0-47% ermitteln. Dabei zeigten Nachkommen von 50% der 24 F1-Linien eine Transpositionsfrequenz von 0-20%, die restlichen 12 eine Transpositionsfrequenz von 20-47%. Enoki *et al.* (1999) konnten in vier unterschiedlichen transgenen Familien variable Transpositionsfrequenzen für *Ac* von 40,9%, 22,5%, 8,3% und 19% feststellen. Auch in einer anderen Studie von autonomen *Ac*-Elementen in Reis variieren die Transpositionsfrequenzen in den Nachkommen von drei Linien aus unabhängigen Primärregeneraten von 15-50% (Greco *et al.* 2001). Kolesnik *et al.* (2004) konnten in ihrem *Ac*-basierten *gene trap*-System in Reis für die Nachkommen von 13

unabhängigen Kreuzungskombinationen eine germinale Transpositionsfrequenz von 16-73% in der F2-Generation feststellen.

Die in den Southernblotanalysen der GT-F2-Population ermittelten Transpositionsraten (Tab. 6) wurden für unabhängige GTDsB-Parentallinien berechnet. Die Transpositionsfrequenz variiert in den Nachkommen unabhängiger GTDsB-Parentallinien von 5-67% (Tab. 12). Die Anzahl an getesteten Pflanzen pro unabhängiger GTDsB-Parentallinie ist mit 9 bis 60 klein, so dass die Ergebnisse nur als Hinweise gewertet werden.

Tab. 12: Transpositionsfrequenzen in der F2-Generation unabhängiger GTDsB-Parentallinien

GTDsB-Parentallinie	Anzahl der GTDsB-Insertionsloci	Anzahl der analysierten Pflanzen	Unabhängige Transpositionsereignisse	Transpositionsfrequenz in %
2a	1-2	10	2	20
23	1-2	14	7	50
31B	2	9	2	22
6c/6a	2-4	18	5	28
31A	4	11	2	18
16	3-5	15	5	33
14A	5-6	9	1	11
11	5-8	60	11	18
10	6-7	21	1	5
14B	8-10	12	5	42
26	12	12	8	67
Summe		191	49	26

Die unabhängigen GTDsB-Parentallinien differieren stark in der Zahl an GTDsB-Integrationsloci. Alle GTDsB-Parentallinien enthalten mindestens ein vollständiges GTDsB-Konstrukt (Abb. 7). Darüber hinaus muss aufgrund der Ergebnisse der Southernblotanalysen angenommen werden, dass in der Mehrheit der Linien eine variable Anzahl an weiteren Kopien vorliegt, die rearrangiert sein können (Tab. 3). Aufgrund der Hinweise auf Rearrangements (Tab. 3) muss davon ausgegangen werden, dass nicht alle GTDsB-Kopien zur Transposition fähig sind. Für die Transposition von *Ac/Ds*-Elementen müssen die ca. 240 bp-langen subterminalen Sequenzen und die 11 bp-langen TIR konserviert sein (Kunze 1996, zur Übersicht). Es sind zudem aufgrund von funktionalen Unterschieden jeweils ein 5' und ein 3' Ende obligatorisch für die Transposition. Direkter DNA-Transfer wie bei der biolistischen Transformation von Pflanzengewebe ist dafür bekannt häufig zu *multicopy*-Insertionen an einem einzelnen Locus zu führen (Kohli *et al.* 1998). Einen deutlichen Vorteil in diesem Zusammenhang bietet die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation mit T-DNA. Diese Methode resultiert in der Integration von einer bis wenigen Kopien des Transgens in das Pflanzengenom (Dai *et al.* 2001). Die Transformation von Gerste mit T-DNA wurde Mitte der 90iger Jahre erstmals beschrieben (Tingay *et al.* 1997).

Die in den Nachkommen unabhängiger GTDsB-Parentallinien variierende Transpositionsfrequenz spiegelt möglicherweise Effekte der chromosomalen Position der GTDsB-Konstrukte auf die Transposition wieder. Kolesnik *et al.* (2004) haben die Transpositionsfrequenz für unabhängige *Ds*-Linien in Präsenz der gleichen Transposase-Quelle verglichen und festgestellt, dass der *Ds*-Donorlocus die Transposition beeinflusst. Bereits in Mais wurde eine große Varianz der Transpositionsfrequenz von *Ac/Ds*-Elementen beobachtet. Die germinale Exzisionsfrequenz von *Ac* und *Ds* an unterschiedlichen Loci kann von 0,01% bis über 15% variieren (Döring 1989, zur Übersicht). Die für den Transpositionsvorgang essentielle Transposase erkennt die hexameren Motive AAACGG in den subterminalen Sequenzen an beiden Enden von *Ac* (Kunze und Starlinger 1989). In diesen TPase-Bindestellen befinden sich potentielle Methylierungsstellen und die DNA-Bindung durch die Transposase ist von dem Status der Methylierung der Ziel-DNA abhängig (Kunze 1996). Die Methylierung in Pflanzengenomen ist ein wichtiger Faktor der Regulation (Finnegan *et al.* 1998, Finnegan 2000, zur Übersicht). Das Muster der Methylierung entsteht zum einen durch die Weitergabe der Methylierungsmuster nach der DNA-Replikation durch *maintenance*-Methyltransferasen zum anderen durch eine *de novo*-Methylierung von neu replizierter DNA. Die Verteilung von Methylcytosin in Pflanzengenomen ist nicht zufällig. Am stärksten ist repetitive DNA im Heterochromatin methyliert (Bennetzen *et al.* 1988, Bennetzen 1996).

In Zusammenhang mit der Bedeutung der genomischen Position für die Transpositionsfrequenz kann sich durch eine größere Anzahl an GTDsB-Integrationsloci, die Wahrscheinlichkeit, dass sich funktionale Elemente an günstigen genomischen Positionen befinden, erhöhen. Die beiden GTDsB-Linien 23 und 26, die mit 50% und 67% die beiden höchsten Transpositionsraten zeigen, differieren mit 1-2 bzw. 12 stark in der Anzahl der GTDsB-Integrationsloci (Tab 12). Die Southernblotanalysen der Linie GTDsB 12 indizieren eine große Zahl an rearrangierten Konstrukten (Tab. 3). Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass erwartungsgemäß die Position der GTDsB-Elemente im Genom und potentielle Rearrangements dieser einen stärkeren Einfluss auf die Transpositionsfrequenz haben als die Anzahl der Integrationsloci.

Für die Effizienz des *gene trap*-Systems ist die Weitergabe einer hohen Anzahl von unabhängigen Transpositionen an die Nachkommen von Bedeutung. Die Größe der notwendigen *gene trap*-Population mit Insertionen des *gene trap*-Konstrukts in möglichst vielen Genen kann so verringert werden. Der Zeitpunkt der Transposition in der Entwicklung einer Pflanze bestimmt die Vererbung der Transpositionsergebnisse an die Nachkommen. Transpositionen früh in der Pflanzenentwicklung können an alle Nachkommen weitergegeben werden. Wenn das *gene trap*-Konstrukt zu einem späten Zeitpunkt in der Entwicklung der Pflanze transponiert, in den keimbahnkompetenten Zellen, erhalten die Nachkommen unabhängige, germinale Transpositionsergebnisse.

Ein entscheidender Faktor, der den Zeitpunkt der Transposition bestimmt ist die Expression der Transposase. Es wurde gezeigt, dass ein hoher Level an Transposase-Expression mit Transpositionen früh in der Entwicklung korreliert (Balcells und Coupland 1994, Jones *et al.* 1989, Keller *et al.* 1993, Long *et al.* 1993). Koprek *et al.* (2000) konnten beobachten, dass in

Pflanzen, in denen die Transposase unter Kontrolle des starken *Ubiquitin*-Promotors exprimiert wurde, mehrere Nachkommen das gleiche Muster an Transpositionereignissen aufweisen. Im Gegensatz dazu enthielten Pflanzen, in denen die Transposase unter der Kontrolle des *Ac*-Promotors exprimiert wurde, eine hohe Anzahl an Transpositionen, die spät in der Entwicklung oder direkt in den Keimbahn-kompetenten Zellen stattgefunden haben müssen. Sie schließen daraus, dass die Expression der Transposase durch den *Ac*-Promotor zu einer höheren Zahl an unabhängigen Transpositionen führt, die an die nächste Generation weitergegeben werden, als die Expression der Transposase durch den Mais *Ubiquitin*-Promotor. Greco *et al.* (2001) konnten demonstrieren, dass die Präsenz eines doppelten *enhancer*-Elements des CaMV 35S-Promotors in der Nähe des *Ac*-Transposase-Promotors eine sehr frühe Exzision von *Ac*, direkt nach der Transformation in die Pflanzenzelle, induziert. Ähnliches wurde auch in *Arabidopsis* (Balcells and Coupland 1994, Honma *et al.* 1993, Smith *et al.* 1996) und Tabak (Keller *et al.* 1993) beobachtet. Späte Transpositionen und somit Nachkommen mit unabhängigen Transpositionen konnten in *Arabidopsis*, Tomate und Gerste beobachtet werden, wenn die Wildtyp *Ac*-Transposase eingesetzt wurde (Bancroft und Dean 1993, Rommens *et al.* 1993, Koprek *et al.* 2001). Kolesnik *et al.* 2004 haben in ihrem Zweikomponenten-*gene trap*-System in Reis die *Ac*-Transposase unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors eingesetzt und haben Hinweise darauf, dass *Ds* spät in der Reisentwicklung transponiert.

In der GT-F2-Population konnte eine hohe Zahl an unabhängigen Transpositionen von GTDsB detektiert werden. In 49 der insgesamt 79 Pflanzen mit Transposition sind die Transpositionereignisse unabhängig (Tab. 6). Bei diesen Transpositionen kann es sich um Ereignisse handeln, die zu einem sehr späten Zeitpunkt in der F1-Generation, in den Keimbahn-kompetenten Zellen, oder zu einem frühen Zeitpunkt in der F2-Generation stattgefunden haben. In den Nachkommen der F1-Linien GT73 und GT82 konnte jeweils in allen 4 bzw. 3 Pflanzen Transposition von GTDsB, die auf einem einzigen Transpositionereignis beruht, detektiert werden (Tab. 6). Das ist der Hinweis auf eine Transposition des GTDsB-Konstrukts zu einem frühen Zeitpunkt in der Entwicklung der F1-Pflanze. In den Nachkommen der Linien GT32, GT29, GT41, GT49, GT54, GT38, GT19, GT40, GT13, GT80 konnten Transpositionereignisse, die an mehrere, aber nicht an alle, Nachkommen vererbt wurden, detektiert werden (Tab. 6). Zum Beispiel konnte in allen vier Nachkommen der Linie GT40 Transposition von GTDsB detektiert werden. Dabei wurde in den Southernblotanalysen in jeweils zwei Nachkommen das gleiche Hybridisierungsmuster identifiziert, was auf insgesamt zwei unabhängige Transpositionen des GTDsB-Konstrukts hinweist (Daten nicht gezeigt). Da die Körner zur Herstellung der Nachkommen, mit Ausnahme von GT80, jeweils von einer Ähre der GT-F1-Pflanzen geerntet wurden, muss die Transposition in einem Sektor der Ähre und zu einem Zeitpunkt der Entwicklung stattgefunden haben, der zur Vererbung des Transpositionereignisses an mehreren, aber nicht allen Nachkommen führt. Als weitere Erklärungsansätze sind Sekundärtranspositionen und die Segregation von GTDsB-Insertionen denkbar. Segregation ist z. B für die Nachkommen der beiden F1-Linien GT19 und GT13, in denen jeweils in drei von vier analysierten Nachkommen ein unabhängiges Transpositionereignis detektiert wurde, vorstellbar. Eine Voraussetzung dafür wäre angesichts der geringen Zahl an analysierten Nachkommen eine

ungekoppelte Transposition des GTDsB-Konstrukts. Koprek *et al.* (2000) haben in Gerste gezeigt, dass von transponierten *Ds*-Elementen 75% in gekoppelte und 25% in ungekoppelte chromosomale Regionen des Genoms reintegriert sind. Für das *Ac*-Element wurde gezeigt, dass es in Mais sowie in einigen heterologen Pflanzen wie Tabak und *Arabidopsis* mit einer hohen Frequenz in Positionen, die sich in enger Nachbarschaft zu den Donorstellen befinden, integriert (zur Übersicht Kunze 1996). In Zusammenhang mit Sekundärtranspositionen sind die Linien GT38, GT40 und GT41 interessant. In diesen konnte jeweils in allen Nachkommen mit Ausnahme von einer das gleiche Transpositionsereignis, also jeweils zwei unabhängige Transpositionsereignisse detektiert werden (Tab. 6). So ein Muster kann auf eine Primärtransposition des GTDsB-Konstrukts in der GT-F1-Generation und einer anschließenden Sekundärtransposition des transponierten GTDsB-Konstrukts in einer GT-F2-Pflanze zurückzuführen sein. Die hohe Zahl an unabhängigen Transpositionen verspricht eine effiziente Weitergabe an unabhängigen GTDsB-Integrationen im Rahmen einer *gene trap*-Population.

4.2 Einfluss der Transposase auf die Transposition von GTDsB

Für die Etablierung der *gene trap*-Population wurden vier unabhängige Transposase-Linien mit einer bis vier Kopien von zwei verschiedenen immobilisierten *Ac*-Konstrukten eingesetzt (3.1.2). Es ergeben sich daher zwei interessante Fragen: Führen die unterschiedlichen TPase-Konstrukte zu verschiedenen Transpositionsfrequenzen? Und: Hat die Anzahl der Kopien einen Einfluss auf die Transpositionsfrequenz?

Die beiden Linien DHcw21 und cw74 enthalten eine bzw. vier Kopien des Konstrukts cwAc Δ 102 (2.1.8.1). Das Konstrukt exprimiert eine N-Terminal um 102 Aminosäuren verkürzte Transposase. Diese induziert in Petunien-Protoplasten (Houba-Hérin *et al.* 1990; Becker *et al.* 1992) und transgenem Tabak (Kunze *et al.* 1995) eine höhere Exzisionsfrequenz des *Ac*-Elements als die Wildtyp-Transposase. Der deletierte Bereich wird als putativer Silencer verstanden. Es wird diskutiert, dass aufgrund eines auto-inhibitorischen Effekts hoher TPase-Konzentrationen die niedrigere Konzentration der N-terminal verkürzten Transposase eine höhere Transpositionsaktivität bedingt (Kunze 1996). Die beiden Linien cw34 und DHcw42 enthalten das immobilisierte Konstrukt cwAc, von welchem aus eine Wildtyp-*Ac*-Transposase exprimiert wird (2.1.8.1). Die Southernblotanalysen der GT-F2-Population haben die Transposition von GTDsB-Konstrukten in den Nachkommen aus Kreuzungen mit allen vier Transposase-Linien gezeigt (Tab. 6). Für die drei Transposase-Linien DHcw21, DHcw42 und cw74 wurden GT-F2-Pflanzen aus Kreuzungen mit jeweils 8, 8 und 11 unabhängigen GTDsB-Linien analysiert (Tab. 6). Die Transpositionsfrequenzen in den Nachkommen aus Kreuzungen mit DHcw21, DHcw42 und cw74 liegen bei 26% (10/39), 13% (4/30) und 27% (31/115). Für die Transposase-Linie cw34 werden die Ergebnisse als nicht repräsentativ gewertet, da nur sieben GT-F2-Pflanzen aus Kreuzungen mit nur zwei unabhängigen GTDsB-Linien analysiert wurden. In den Nachkommen der Linien DHcw21 und cw74 konnten die höchsten, nahezu identischen Transpositionsfrequenzen detektiert werden. Damit liegt ein erster Hinweis darauf vor, dass die N-Terminal um 102 Aminosäuren verkürzte Transposase in Gerste eine höhere

Transpositionsfrequenz von GTDsB induziert. Endgültigere Erkenntnisse dazu sind im Hinblick auf die Auswahl von besonders für ein *gene trap*-System geeigneten GT-Linien interessant und müssen in weiteren Experimenten erbracht werden.

Für die Transposition von *Ac* ist eine Autoregulation bekannt, die im Zusammenhang mit ihrer mutagenen Rolle im Genom als wichtig erscheint (Kunze 1996, zur Übersicht). In Mais konnte für *Ac* ein Dosiseffekt beobachtet werden (McClintock 1948, 1951). Eine Erhöhung der Anzahl an *Ac*-Kopien im Endosperm resultiert in einer in der Entwicklung verzögerten Transposition und in einer Abnahme der Transpositionsfrequenz (McClintock 1948, 1951). Der Dosiseffekt scheint für Mais spezifisch und eine Funktion der Konzentration der Transposase zu sein. Die Anzahl der *Ds*-Elemente hingegen zeigt keinen Einfluss (Dooner *et al.* 1986, Bancroft and Dean 1993). Für heterologe Systeme wie *Arabidopsis* (Keller *et al.* 1992, Dean *et al.* 1992, Bancroft and Dean 1993) und Tabak (Keller *et al.* 1993) wurde für *Ac* ebenfalls ein Dosiseffekt beschrieben. Hier steigt allerdings die Transpositionsfrequenz mit zunehmender Konzentration der Transposase. Die Regulation der Expression der Transposase ist sehr komplex und kann auf verschiedenen Ebenen transkriptional bis post-translational geschehen (Kunze *et al.* 1993, Scofield *et al.* 1993, Fridlender *et al.* 1996, Heinlein *et al.* 1994, Wang und Kunze 1998, Scortecci *et al.* 1999). Scofield *et al.* (1993) konnten zeigen, dass die Expression der Transposase unter dem CaMV 35S-Promotor über einer bestimmten Menge hinaus die Exzision von *Ac/Ds*-Elementen in transgenem Tabak inhibiert. Sie schlagen ein Modell für den Dosiseffekt in Mais vor, welches auf einem inhibitorischen Niveau der Transposase-Expression als eine Möglichkeit der Autoregulation der Transpositionsaktivität von *Ac* basiert. Es ist bekannt, dass *Ac*-Elemente epigenetisch durch Methylierung von Cytosin in oder in Nähe des Promotors reversibel inaktiviert werden können (Kunze *et al.* 1997). Diese Methylierungen führen zu einer starken Reduktion der Transkription, so dass ausreichende Mengen der Transposase für die Induktion detektierbarer Transpositionen, nicht mehr zur Verfügung stehen (Kunze *et al.* 1988, Brutnell und Dellaporta 1994).

Aus den Ergebnissen der Southernblotanalysen (Tab. 6) ergibt sich für die Nachkommen aus Kreuzungen mit den Transposase-Linien DHcw21 und cw74 mit 26% und 27% eine annähernd gleiche Transpositionsfrequenz. Die Transposase-Linie DHcw21 enthält eine und die Transposase-Linie cw74 vier Kopien des Transposase-Konstrukts cwAc Δ 102 (2.1.8.1). Im Vergleich dazu ist die Transpositionsfrequenz von 13% in den Nachkommen aus Kreuzungen mit DHcw42, die zwei Kopien des Transposase-Konstrukts cwAc enthält (2.1.8.1), nur halb so hoch. Aufgrund der verschiedenen Transposase-Konstrukte erscheint nur der Vergleich zwischen DHcw21 und cw74, die beide das cwAc Δ 102-Konstrukt enthalten, als sinnvoll. Möglicherweise liegt somit ein Hinweis darauf vor, dass die Kopienzahl der Transposase keinen Einfluss auf die Transpositionsfrequenz hat. Die Datenmenge muss allerdings für eine endgültige Aussage erhöht werden. Auch Koprek *et al.* (2000) konnten in Gerste beobachten, dass die Kopienzahl der Transposase nicht die Transpositionsfrequenzen zu beeinflussen scheint. Ein Einfluss der Anzahl an Transposase-exprimierenden Konstrukten auf die Transpositionsfrequenz konnte somit nicht festgestellt werden. Es liegen allerdings Hinweise dafür vor, dass die N-Terminal um 102 Aminosäuren verkürzte TPase höhere Transpositionsfrequenzen des GTDsB-Konstrukts in Gerste induziert.

4.3 Expression des *gus*-Reportergens und Vergleich zu anderen *gene trap*-Systemen

Das erste *gene trap*-System für Pflanzen wurde von Sundaresan *et al.* (1995) in *Arabidopsis* etabliert. Das verwendete *gene trap*-Konstrukt basiert auf dem nicht-autonomen Element *Ds* und enthält das promotorlose Reportergen *gus*. In einem Zweikomponenten-System wurde mit Hilfe des Gens für eine Indoleisessig-Hydrolase (IAAH), das eine Sensitivität gegenüber NAM (Naphtalenacetamid) verleiht, gegen die T-DNA-Donorstelle transponierter *gene trap*-Konstrukte sowie dem Transposase-Konstrukt selektiert. Mit einem Resistenzgen (NPTII) in dem *gene trap*-Konstrukt konnte so mit Kanamycin erfolgreich auf Linien mit ungekoppelt transponierten und stabilisierten *gene trap*-Konstrukten selektiert werden. Von diesen wurden ganze Keimlinge und Blüten histochemisch auf GUS-Färbung untersucht. Von Chin *et al.* (1999) wurde das erste *gene trap*-System in einer monokotylen Pflanze publiziert. Sie setzten in Reis zum einen das *gene trap*-Konstrukt von Sundaresan *et al.* (1995) sowie ein *gene trap*-Konstrukt mit 3'Sequenzen des dritten *Adh1*-Introns aus Mais ein, in welches zusätzliche, künstliche Spleißakzeptorstellen eingeführt wurden. Über Southernblotanalysen wurden Pflanzen mit transponierten *gene trap*-Konstrukten selektiert und ausgewachsene und junge Blüten dieser histochemisch analysiert.

Der in dieser Arbeit für ein *gene trap*-System in Gerste vorgestellte Ansatz unterscheidet sich in einem wichtigen Punkt von den Systemen von Sundaresan *et al.* (1995) und Chin *et al.* (1999). Das Konzept beinhaltet nicht die Selektion von Pflanzen mit transponierten *gene trap*-Konstrukten für die Analysen zur GUS-Expression. Es wurde somit eine im Vergleich zu den von Sundaresan *et al.* (1995) und Chin *et al.* (1999) beschriebenen Frequenzen von 26% (64/246) und 16% (19/121) geringere Frequenz an GUS-Expression erwartet. Die auf GUS-Expression untersuchte GT-F2-Population entspricht mit 141 Pflanzen der Größenordnung der von Sundaresan *et al.* (1995) und Chin *et al.* (1999) untersuchten Populationen. Um die Wahrscheinlichkeit der Detektion von GUS-Expression zu erhöhen, wurde daher entschieden mit Blatt, Nodien, unbefruchteten Blüten, befruchteten Blüten, Körnern und Keimlingen eine größere Zahl verschiedener Organe zu untersuchen (Abb. 12).

Die Effizienz der Identifikation von GUS-Expression ist in dem *gene trap*-System aus *Arabidopsis* im Vergleich zu dem in Reis etwas höher. In dem System von Sundaresan *et al.* (1995) zeigten 26% (64/246) der untersuchten Pflanzen eine auf einzelne Gewebe beschränkte GUS-Expression. Chin *et al.* (1999) konnten in 15,7% (19/121) der untersuchten Reispflanzen GUS-Expression in Blütenorganen detektieren. Da im Durchschnitt zwei Kopien des *gene trap*-Konstrukts pro Reispflanze präsent sind, beträgt die Frequenz der GUS-Expression transponierter *gene trap*-Konstrukte in den Blüten 7,9%. Sundaresan *et al.* (1995) haben die GUS-Expression in Keimlingen und Blüten von 246 *gene trap*-Linien der F3-Generation mit unabhängigen Transpositionsereignissen untersucht. Die untersuchte F3-Generation geht auf eine *gene trap*-Linie, die mit drei unabhängigen Transposase-exprimierenden Linien gekreuzt wurde zurück. Chin *et al.* (1999) haben 121 T1-Pflanzen mit transponierten *gene trap*-Konstrukten von drei unabhängigen Primärregeneraten analysiert. Diese wurden mit einer T-DNA transformiert, die das Transposase-exprimierende und das *gene trap*-Konstrukt enthält.

In dieser Arbeit wurden zur Etablierung der *gene trap*-Population 11 unabhängige GTDsB-Parentallinien eingesetzt (Tab. 4). Der Einsatz einer größeren Zahl an unabhängigen GTDsB-Parentallinien erschien in Zusammenhang mit den unter 4.1 diskutierten Positionseffekten als sinnvoll. In nicht Transposon-basierten *gene trap*-Systemen ist die Frequenz der detektierten GUS-Expression niedriger. Die Transformation des Moores *Physcomitrella patens* über homologe Rekombination mit einem *gene trap*-Konstrukt hat zu der Expression von GUS in 3-4% der 235 untersuchten *gene trap*-Linien geführt (Hiwatshi *et al.* 2001). Das *gene trap*-Konstrukt hat nur eine Spleißakzeptorstelle, die von dem verwendeten *GPA1*-Intron aus *Arabidopsis* zur Verfügung gestellt wird. Daher führt nur eine Insertion in der richtigen Orientierung und dem richtigen Leserahmen zu einem funktionalen Protein. In einem T-DNA-basierten *gene trap*-System in Reis konnte eine Frequenz der GUS-Expression von 1,6-2,1% in verschiedenen Organen festgestellt werden (Jeon *et al.* 2000). Es wurden dabei Blätter, Wurzeln, Blüten und unreife Körner von bis zu 5353 transgenen Reislinien histochemisch analysiert.

Von den 141 in einem histochemischen GUS-Assay untersuchten GT-F2-Pflanzen konnte in 72 (51%) eine Aktivität der β -Glukuronidase detektiert werden (Tab. 9). Es konnte in den Nachkommen aus Kreuzungen von allen 11 GTDsB-Parentallinien eine Expression des Reportergens detektiert werden. In den Nachkommen der vier F1-Linien GT33, GT39, GT4 und GT40 wurde keine Expression des *gus*-Reportergens detektiert (Tab. 8). Eine fehlende Transposition des GTDsB-Konstrukts kann als Ursache ausgeschlossen werden, da in den Nachkommen von allen vier Linien Transpositionen nachgewiesen werden konnten (Tab. 6). Für die Linie GT4 konnten sogar in fünf der sieben untersuchten Nachkommen unabhängige Transpositionsereignisse detektiert werden. Von der Linie GT39 wurde nur eine einzige GT-F2-Pflanze analysiert, so dass die Wahrscheinlichkeit GUS-Expression in dieser Linie zu detektieren klein war.

In dem *gene trap*-System von Sundaesan *et al.* (1995) trat die *gus*-Expression in 55% der Linien in mehreren Organen der untersuchten Keimlinge und Blüten auf. Die restlichen 45% zeigten GUS-Färbung, die auf einzelne Gewebe wie z.B. Wurzeln, Kotyledonen oder Blüten beschränkt ist. In ihrem *gene trap*-System in Reis konnten Jeon *et al.* (2000) viele Gewebe- oder Organ-spezifische Expressionsmuster des *gus*-Reporters beobachten. Von den 2,1% Linien mit *gus*-Expression in den Wurzeln zeigten 32,7% GUS-Aktivität in der Wurzelspitze und Zellteilungs-, Elongations- und Differenzierungszone und 32,7% ausschließlich in der Differenzierungszone. In dem System in Gerste konnte in allen in dem GUS-Assay analysierten Organen bzw. Entwicklungsstadien eine Aktivität von GUS nachgewiesen werden (Tab. 10). In 49 der 72 GT-F2-Pflanzen mit GUS-Expression trat diese in nur einem Organ auf (Daten nicht gezeigt). In 17 bzw. 5 GT-F2-Pflanzen konnte GUS-Expression in zwei bzw. drei bis vier der getesteten Organe detektiert werden. GUS-Expression in allen Organen konnte nur in der F2-Pflanze GT 80/3 detektiert werden.

Die Frequenzen mit denen GUS-Aktivität in den F2-Pflanzen nachgewiesen werden konnte schwanken in Abhängigkeit von dem jeweiligen Organ zwischen 3,5% und 28% (Tab. 10). Auffallend ist, dass in den Organen in denen Gewebe der GT-F3-Generation vertreten sind,

den Körnern und Keimlingen, die Frequenz an Pflanzen mit GUS-Aktivität deutlich auf 28% bzw. 23% ansteigt (Tab. 10). Jeon *et al.* (2000) konnten in ihrem Ansatz zur Insertionsmutagenese mit einem T-DNA-Konstrukt, welches ein *gene trap* mit dem β -Glukuronidase-Reportergen enthält, homogene Frequenzen der GUS-Aktivitäten in unterschiedlichen Geweben feststellen. Die Frequenzen der GUS-Expression in Blättern, Wurzeln, Blüten und unreifen Körnern betragen 2% (106/5353), 2,1% (113/5353), 1,9% (133/7026) und 1,6% (31/1948). Für den Anstieg der Frequenz an GUS-Expression in der F3-Generation muss daher ein Zusammenhang mit der Transposition von GTDsB angenommen werden. In den Geweben der GT-F3-Generation können sich, zusätzlich zu den Ereignissen der vorangehenden Generationen, germinale Transpositionereignisse der GT-F2-Generation und frühe somatische Transpositionen in der GT-F3-Generation manifestieren.

Die Transpositionsfrequenzen von 26% in *Arabidopsis* (Sundaresan *et al.* 1995) und 16% in Reis (Chin *et al.* 1999) beziehen sich auf Pflanzen mit transponierten *gene trap*-Konstrukten. Um den *gene trap*-Ansatz in Gerste mit den anderen Systemen zu vergleichen, muss daher die Transpositionsfrequenz von GTDsB berücksichtigt werden. Für die GT-F2-Population konnte eine Transpositionsfrequenz von 26% ermittelt werden (Tab. 6). Aus der in dem monokotylen System Reis pro transponiertem *gene trap*-Konstrukt gezeigten Frequenz der GUS-Expression von 8% (Chin *et al.* 1999) und einer Transpositionsfrequenz von 26% in der GT-F2-Population ergibt sich eine theoretische Frequenz der GUS-Expression von 2%. Interessanterweise entspricht diese theoretische Frequenz in der Größenordnung der von Bergmann (2003) in seinem *gene trap*-Ansatz in Gerste mit dem Konstrukt GTDsA ermittelten. In den 1592 histochemisch untersuchten Keimlingen der GT-F3-Generation konnte in 19 eine GUS-Expression detektiert werden. Wird berücksichtigt, dass aufgrund der Vererbung nur in 75% der Keimlinge eine GUS-Expression überhaupt erwartet werden kann, entspricht das einer Frequenz von 1,6%. Die Frequenz von 10% an Pflanzen der GT-F2-Population mit Hinweisen auf eine GUS-Expression nach einer vererbbaaren Transposition des *gene trap*-Konstrukts (Tab. 11) ist im Vergleich zu der theoretisch aus der Leistung des *gene trap*-Systems von Chin *et al.* (1999) berechneten Frequenz fünf mal so hoch. Zusammen mit den Ergebnissen zur GUS-Expression in dem *gene trap*-System mit GTDsA (Bergmann 2003) ist das ein Hinweis auf eine erhöhte Leistung des GTDsB-basierten Systems, die möglicherweise durch das optimierte Konstrukt GTDsB vermittelt wird.

Eine weitere bei der Konzeption der Untersuchungen zur GUS-Expression in der GT-F2-Population berücksichtigte Problemstellung war die Identifizierung von GUS-Expression, die auf vererbbaaren Transpositionen des GTDsB-Konstrukts beruht. Nur diese können im Unterschied zu rein somatischen Ereignissen in den nachfolgenden Generationen analysiert werden. Um die Identifizierung von Kandidaten mit vererbbaaren Transpositionereignissen zu ermöglichen, wurde entschieden jeweils mehrere Explantate der Blüten, Körner und Keimlinge zu analysieren (Abb. 12). Wenn mehrere oder alle Explantate eines Organtyps die gleiche GUS-Expression zeigen, ist das ein Hinweis auf ein vererbbares Ereignis (Erläuterungen dazu unter 3.4.1). In 58% der Fälle in denen GUS-Expression detektiert werden konnte, trat die GUS-Expression in einem einzigen Explantat des jeweiligen Organtyps auf (Daten nicht gezeigt). Für GUS-Expression, die nur in einem Explantat auftritt,

muss angenommen werden, dass sie die Folge somatischer Transposition des GTDsB-Konstrukts ist. Die Größe des betroffenen somatischen Sektors kann dabei Hinweise auf den Zeitpunkt der Transposition liefern. Ein Beispiel für so ein Ereignis ist der in Abb. 14 abgebildete Keimling der F2-Pflanze GT37/6. Eine Expression des *gus*-Reportergens konnte nur in einem von acht getesteten Keimlingen detektiert werden (Tab. 8). Das Produkt der GUS-Reaktion war in mehreren Zellen eines runden, somatischen Sektors des Skutellums lokalisiert. Das ist der Hinweis auf eine frühe Transposition des GTDsB-Konstrukts in eine exprimierte genomische Sequenz in einer Zelle des Skutellums. Anschließende Zellteilungen haben wahrscheinlich zur Vergrößerung des betroffenen somatischen Sektors geführt. Eine alternative Erklärung wäre, dass GTDsB in ein Gen gesprungen ist, das nur in diesem beschränkten Sektor des Skutellums exprimiert wird.

In insgesamt 14 Pflanzen der GT-F2-Population gibt es Hinweise auf eine GUS-Expression nach einer vererbaren Transposition des *gene trap*-Konstrukts (Tab. 11). Das impliziert eine Frequenz der GUS-Expression von 10%. Es sind Nachkommen von insgesamt fünf unabhängigen GTDsB-Parentallinien (Tab. 9). Für drei der fünf vertretenen GTDsB-Parentallinien, GTDsB 23, GTDsB 14B und GTDsB 26, konnte in den Untersuchungen zur Transposition von GTDsB eine besonders hohe Transpositionsfrequenz festgestellt werden (Tab. 12). In acht der 14 Pflanzen beruhen die Hinweise auf vererbare Transpositionereignisse auf GUS-Expression in Geweben der GT-F3-Generation. Das kann in einem Zusammenhang mit der Ausprägung von Ereignissen der GT-F2-Generation in der GT-F3-Generation stehen. In vier der 14 GT-F2-Pflanzen, GT54/10, GT13/8, GT15/4, GT15/9 konnte in Southernblotanalysen eine Transposition des GTDsB-Konstrukts detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Hinweise für einen Zusammenhang der Transposition mit der GUS-Expression müssen in weiteren Analysen erbracht werden.

Für Blatt und Nodium wurden pro Pflanze jeweils nur ein bzw. zwei Explantate gefärbt (Abb. 12). Die Auswertung der Ergebnisse im Hinblick auf vererbare Transpositionereignisse erfolgte daher unter anderen Gesichtspunkten und erfordert weitere Analysen. Obwohl die Wahrscheinlichkeit gering war, konnte GUS-Expression im Blatt in drei von 99 getesteten Explantaten detektiert werden (Tab. 8 und Tab. 9). Mit dem experimentellen Ansatz für das Blatt sind Ereignisse detektierbar, die auf einer Transposition des GTDsB-Konstrukts in der GT-F1-Generation oder früh in der GT-F2-Generation beruhen. Eine in der Entwicklung der GT-F2-Pflanze sehr frühe Transposition von GTDsB in einem Halm der Pflanze kann über die Keimbahn-kompetenten Zellen an die nächste Generation vererbt werden. Die Expression in den Blättern ist daher durchaus als ein Hinweis auf ein vererbbares Ereignis zu werten. Die Lokalisation der GUS-Aktivität in allen drei Explantaten entlang der Leitbündel (Daten nicht gezeigt), muss nicht mit einem gewebespezifischen Expressionsmuster in Zusammenhang stehen. Jeon *et al.* (2003) haben bei GUS-Färbungen von Blättern eine starke Färbung vor allem an den Schnittkanten und entlang der Leitbündel beobachtet. Als Grund wird die hohe Konzentration an Zellulose, Lignin und Wachsen in der Epidermis der Blätter, die das Eindringen des Substrats an der Blattoberfläche erschwert, diskutiert.

In allen GT-F2-Pflanzen mit GUS-Expression in den Nodien konnte diese in jeweils nur einem der beiden untersuchten Explantate detektiert werden. Das weist im Fall der Nodien nicht zwingend auf ein somatisches Ereignis hin. Die Nodien wurden zwar von einem Halm geerntet, aber individuelle Unterschiede in den Entwicklungsstadien sind möglich. In allen vier bzw. drei getesteten Nachkommen der Linien GT80 und GT82 konnte GUS-Expression in jeweils einem der beiden analysierten Nodien detektiert werden (Tab. 9). Das kann zum einen auf eine frühe Transposition des GTDsB-Konstrukts in der jeweiligen GT-F1-Pflanze zurückzuführen sein, die an alle Nachkommen vererbt wurde. Als zweite Möglichkeit ist die Integration von GTDsB in die exprimierte genomische Sequenz bei der Transformation der GTDsB-Parentallinie denkbar. Für die erste Möglichkeit spricht, dass in allen drei Nachkommen der Linie GT82 das gleiche Transpositionereignis detektiert werden konnte (Tab. 6), was eine germinale Transposition von GTDsB in der F1-Generation indiziert. In den vier auf GUS-Expression untersuchten Nachkommen der Linie GT80 hingegen, konnte kein Transpositionereignis detektiert werden. Beide Linien entstammen der gleichen Parentallinie GTDsB 11 (Tab. 9), was ein Argument für die zweite Möglichkeit ist. In den Nachkommen der dritten Linie, die aus Kreuzungen mit GTDsB 11 entstanden ist, GT66, konnte allerdings keine GUS-Expression in den Nodien detektiert werden. Zur Klärung dieser speziellen Frage sind weitere Analysen notwendig.

Der Vergleich von den in Southernblotanalysen nachgewiesenen Transpositionen und der GUS-Expression weist darauf hin, dass in den histochemischen Untersuchungen zur GUS-Expression in der GT-F2-Population viele somatische Ereignisse detektiert wurden. In den Nachkommen der F1-Linien GT22, GT52, GT70, GT67, GT9, GT2 und GT66 konnte eine Transposition des GTDsB-Konstrukts jedoch keine GUS-Expression nachgewiesen werden (Tab. 6 und Tab. 8). Umgekehrt wurde in den Linien GT40, GT33, GT39, und GT4 eine Transposition des GTDsB-Konstrukts detektiert, aber keine Expression des *gus*-Reportergens. Das Transpositionen des GTDsB-Konstrukts nicht zwangsläufig zur Expression des Reporter gens führen und die Detektion von GUS-Expression nicht den Nachweis von Transposition bedingt entspricht den Erwartungen. Eine Voraussetzung für die Expression des Reporter gens ist die Integration des GTDsB-Konstrukts in der richtigen transkriptionalen Orientierung. Das geschieht statistisch betrachtet in 50% der Fälle. In Southernblotanalysen können Transpositionereignisse zudem nur detektiert werden, wenn sie die ganze Pflanze oder zumindest die Blätter aus denen die DNA isoliert wurde betreffen. Im Gegensatz dazu kann im histochemischen GUS-Assay GUS-Expression, die in einzelnen Zelle auftritt, detektiert werden (Jefferson *et al.* 1987, Lindsey *et al.* 1993). Letztendlich muss beachtet werden, dass in den Southernblotanalysen der GT-F2-Generation wahrscheinlich nicht alle Transpositionereignisse erfasst wurden. Als Beispiel konnte Transposition in der F1-Linie GT29 nur in der Southernblotanalyse mit *Bam*HI und nicht mit *Bgl*I oder *Bcu*I detektiert werden (3.2.1).

4.4 Molekularer Nachweis eines *gus*-Fusionstranskripts

Die vier Nachkommen der Linie GT35 zeigen alle das gleiche Muster an GUS-Expression in den Blüten (Tab. 9). Die histochemischen Analysen der zugehörigen Parentallinie GTDsB 26/1 ergaben, dass diese das gleiche Muster an GUS-Expression in den Blüten zeigt. Die Erklärung dafür ist, dass die spezifische GUS-Expression durch eine Integration des GTDsB-Konstrukts bei der Transformation in eine exprimierte genomische Sequenz der Gerste hervorgerufen wird. Entgegen der sich daraus ergebenden Erwartung konnte in den Nachkommen der F1-Linie GT63, die aus Kreuzungen der gleichen Parentallinie GTDsB 26 entstanden ist, das spezifische Expressionsmuster des Reportergens in den Blüten nicht detektiert werden (Tab. 9). Als Ursache sind zwei Möglichkeiten denkbar. Die erste Möglichkeit ist, dass der für die GUS-Expression verantwortliche GTDsB-Integrationslocus aufgrund von Segregation nicht an die Linie GT63 vererbt wurde. Als zweite Möglichkeit ist die Transposition, des für die GUS-Expression in den Blüten verantwortlichen GTDsB-Konstrukts, denkbar. In den Southernblotanalysen der Nachkommen der GT-F1-Linie GT63 konnte keine Segregation von GTDsB-Integrationsloci detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Alle acht untersuchten Nachkommen von GT63 zeigen die gleichen GTDsB-Hybridisierungssignale wie die Parentallinie GTDsB 26/1. In fünf von acht getesteten Nachkommen der F1-Linie GT63 konnte eine unabhängige Transposition des GTDsB-Konstrukts detektiert werden (Tab. 6). Gegen die zweite Erklärung spricht somit, dass in drei Nachkommen der Linie GT63 keine Transposition des GTDsB-Konstrukts detektiert werden konnte. Für beide Möglichkeiten liegen somit keine eindeutigen Hinweise vor. Zur Klärung der Ursache für die fehlende GUS-Expression in den Blüten der Linie GT63 können z.B. weitere Southernblotanalysen mit anderen Restriktionsenzymen durchgeführt werden.

In der Northernblotanalyse von Gesamt-RNA aus Seitenblüten der GUS-exprimierenden Linie GTDsB 26/1 konnten *gus*-Fusionstranskripte nachgewiesen werden (Abb. 18), was der Theorie zum funktionalen Konzept des *gene trap*-Konstrukts entspricht (Abb. 1). Die Isolierung der Sequenzen der 5'Enden der *gus*-Fusionstranskripte mit der 5'RACE zeigt, dass in allen das Transkript des *gus*-Reporters mit Sequenzen des Transformationsvektors pBluescript verspleißt ist (Abb. 20, Abb. 25). Von den insgesamt 18 aus unabhängigen Klonen isolierten 5'Sequenzen von *gus*-Fusionstranskripten sind 15 über die Spleißakzeptorstelle A1 und 3 über die Spleißakzeptorstelle A2 verspleißt (Abb. 25 und 3.5.6). Auch wenn die Population an isolierten *gus*-Fusionstranskripten nicht repräsentativ ist, ist das ein Hinweis auf eine häufigere Benutzung von A1. Für GTDsB wurde in transienten Untersuchungen gezeigt, dass die Spleißakzeptorstellen A2 und A3 ungefähr gleich häufig, aber elfmal seltener als A1 benutzt werden (Bergmann 2003). Die für den Spleißvorgang wichtigen Sequenzen von GTDsB (Abb. 2) wurden für den Einsatz in Monokotyledonen optimiert (Bergmann und Lütticke 2004). Ein wichtiger Punkt bei der Optimierung war im Hinblick auf den für die Auswahl der Spleißakzeptorstellen postulierten *scanning*-Mechanismus (Smith *et al.* 1993) die Schwächung der Spleißakzeptorstelle A1. Im Unterschied zu den bisher untersuchten *gene trap*-Konstrukten (Nussaume *et al.* 1995, Chin *et al.* 1999) konnte für GTDsB die Aktivierung der Spleißstelle A3 gezeigt werden (Bergmann und Lütticke 2004). Der Hinweis auf eine häufigere Nutzung der Spleißakzeptorstelle A1 entspricht den Erwartungen. Die Zahl an in dieser Arbeit isolierten

gus-Fusionstranskripten ist möglicherweise zu limitiert, um die Nutzung der beiden weniger häufig benutzten Spleißakzeptorstellen A2 und A3 zu zeigen. In transienten Tests wurde gezeigt, dass die Spleißakzeptorstellen A2 und A3 mit der annähernd gleichen Frequenz genutzt werden (Bergmann und Lütticke 2004). Folglich kann spekuliert werden, dass aufgrund der nachgewiesenen Nutzung von A2 auch die Nutzung der Spleißakzeptorstelle A3 wahrscheinlich ist. Die Rate mit der GUS-Expression detektiert werden kann steigt, wenn alle Spleißakzeptorstellen genutzt werden, da bei einer Insertion des *gene trap*-Konstrukts in eine exprimierte Gensequenz nur die Nutzung einer der drei möglichen Spleißakzeptorstellen zu einem Transkript führt, von dem aus ein funktionales Reporterprotein gebildet werden kann. Folglich ist die hohe Effizienz der GUS-Detektion in der GT-F2-Population (Tab. 9) ein weiterer Hinweis auf die Nutzung aller drei Spleißakzeptorstellen von GTDsB.

Der molekulare Nachweis des *gus*-Fusionstranskripts 2 (Abb. 30) hat ergeben, dass dieses in den gleichen Stadien der sterilen Seitenblüten der Linie GTDsB 26/1 detektiert werden kann in denen GUS-Expression nachgewiesen wurde (3.5.2). Das ist ein erster Hinweis darauf, dass das Transkript 2 zu der GUS-Expression in den Blüten beitragen könnte. Da in der RT-PCR ein Primer verwendet wurde, der im äußersten 5'Ende der *gus*-Sequenz bindet ist kein Aussage dazu möglich, ob ausgehend von dem Transkript 2 ein funktionales GUS-Protein gebildet werden kann. Um die Beteiligung der isolierten Transkripte an der GUS-Expression in den Blüten eindeutig zu klären, sind weitere Analysen notwendig.

In RT-PCR-Analysen konnten mit Primern für die *gus*-Sequenz und Primern für das Transkript 2 jeweils in den gleichen Entwicklungsstadien steriler Seitenblüten und Geweben der Linie GTDsB 26/1 Produkte amplifiziert werden (Abb. 16 und Abb. 30). Das ist im Zusammenhang mit der Frage, ob andere *gus*-Fusionstranskripte außer dem Transkript 2 möglicherweise an der GUS-Expression in den Blüten der Linie GTDsB 26/1 verantwortlich sind, interessant. In beiden Experimenten (3.5.3 und 3.5.7) konnte das jeweilige Transkript auch in den Nodien detektiert werden. Die Amplifikation der Sequenz von Transkript 2 allerdings war sehr schwach (Abb. 30). Als Grund dafür wäre das zusätzliche Auftreten eines anderen *gus*-Transkripts in den Nodien vorstellbar. Das erscheint in Zusammenhang mit der mit 12 sehr hohen Zahl an GTDsB-Integrationsloci in der Linie GTDsB 26 möglich (Tab. 3).

Die Isolierung von Sequenzen mit der 5'RACE hatte bereits Hinweise darauf geliefert, dass in den Blüten der Linie GTDsB 26/1 eine heterogene Population an *gus*-Fusionstranskripten vorliegt. Diese zeigen alle Identitäten mit den Sequenzen von pBluescript (Abb. 20, Abb. 25 und Abb. 29). Die Integration in eine exprimierte Gen der Gerste muß in dieser GTDsB-Parentallinie bei der Transformation erfolgt sein. Die Gerstenpflanzen wurden biolistisch mit dem Vektor pGTDsB transformiert, der aus dem Vektor pBluescript mit einer Insertion des GTDsB-Konstrukts besteht (2.1.5). Bei der Integration eines vollständigen GTDsB-Konstrukts kann zusätzlich eine variable Länge der pBluescript-Sequenzen zu beiden Seiten des Konstrukts integrieren. Es ist vorstellbar, dass wenn die Integration in eine exprimierte genomische Sequenz der Gerste erfolgt ist, die Expression des Reportergens eines nicht-transponierten GTDsB-Konstrukts und der angrenzenden Vektorsequenzen stattfindet. Das Verspleißen des Transformationsvektors mit dem *gus*-Transkript muss über eine Spleißdonorstelle im pBluescript-Vektor erfolgt sein. Die Sequenzen der isolierten *gus*-Fusionstranskripte indizieren weitere Spleißvorgänge innerhalb des pBluescript-Vektors (Abb. 20, Abb. 25 und Abb. 29).

4.5 Ansätze zur Anwendung der *gene trap*-Linien

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von GT-Linien der Gerste und die Erarbeitung von Erkenntnissen zum Einsatz dieser in einem *gene trap*-Ansatz. Aufgrund der Ergebnisse können erste Antworten auf die eingangs gestellten Fragen gegeben werden.

Der erste für das *gene trap*-System entscheidende Punkt ist die Transposition von GTDsB. In 49 der 191 getesteten Pflanzen (26%) der GT-F2-Population konnten unabhängige Transpositionen detektiert werden. Es gibt Hinweise darauf, dass die Transposition in der Weitergabe einer hohen Zahl an unabhängigen Transpositionsereignissen an die Nachkommen resultiert (4.1, S. 67). Die Voraussetzungen für eine effiziente Verteilung von unabhängigen GTDsB-Insertionen in einer *gene trap*-Population sind somit gegeben. Zudem können GT-Linien selektiert werden, die aufgrund von hohen Transpositionsfrequenzen besonders für eine *gene trap*-Population geeignet sind. Für vier GTDsB-Parentallinien, GTDsB 23, GTDsB 16, GTDsB 14B, GTDsB 26, liegen Hinweise auf eine Transpositionsfrequenz von über 30% vor (Tab. 12). GT-Linien aus Kreuzungen dieser mit den Transposase-Linien DHcw21 und cw74 (Tab. 6), die die N-Terminal verkürzte Transposase exprimieren, erscheinen als besonders geeignet (4.2, S. 71).

Zwei weitere Aspekte können die Nutzung der GT-Linien beeinflussen. Der erste ist der Verlust der Transpositionsaktivität. Die Inaktivierung von *Ac/Ds*-Elementen ist ein Problem welches in Reis beobachtet werden konnte (Izawa *et al.* 1997, Greco *et al.* 2003). Von vier GT-F2-Linien GT54/8, GT29/6, GT49/7 und GT41/3 wurden jeweils 67, 64, 59 und 62 GT-F4-Pflanzen in Southernblotanalysen auf die Transposition der GTDsB-Konstrukte untersucht (Lütticke, persönliche Mitteilung). In allen vier GT-F2-Linien konnten Transpositionsereignisse detektiert werden, die in Keimbahn-kompetenten Zellen der GT-F2- und GT-F3-Generation oder in einem frühen Entwicklungsstadium der GT-F4-Generation stattgefunden haben müssen. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Transpositionsaktivität von GTDsB in der *gene trap*-Population über mehrere Generationen erhalten bleibt. Der andere Punkt, der einen Einfluss auf die Nutzung der GT-Linien in einem Ansatz zur Insertionsmutagenese hat, ist die Frequenz mit der GTDsB in Gensequenzen inseriert. Diese hat einen direkten Einfluss auf die zu analysierende Populationsgröße. In *Arabidopsis* (Parinov *et al.* 1999, Ito *et al.* 2002) und Reis (Enoki *et al.* 1999, Greco *et al.* 2001, Kolesnik *et al.* 2004) transponieren *Ac/Ds*-Elemente präferentiell in codierende genomische Sequenzen. So wurde zum Beispiel für Reis berechnet, dass *Ac* dreimal so häufig als bei zufälligen Integrationen erwartet in Gensequenzen transponiert (Greco *et al.* 2001, Enoki *et al.* 1999). Auch für Gerste belegt eine Studie eine Präferenz für die Insertion von *Ac/Ds*-Elementen in codierende genomische Sequenzen (Cooper *et al.* 2004). Mit Hilfe der *thermal asymmetric interlaced*(TAIL)-PCR (Liu *et al.* 1995) wurden die flankierenden genomischen Sequenzen von 19 transponierten GTDsB-Elementen isoliert (Lütticke, persönliche Mitteilung). Fünf davon zeigen eine Identität zu Sequenzen aus Reis und Weizen. Die restlichen 14 zeigen eine Identität zu ESTs aus Gerste mit einer Ähnlichkeit von über 88% und einem e-Wert $\geq e^{-9}$. Die Anzahl an ESTs aus Gerste in Datenbanken mit der durchschnittlichen Länge von 400 bp beträgt ungefähr 350.000. Das entspricht 3% des gesamten Genoms. Ein zufälliges DNA-Fragment wäre somit mit einer Wahrscheinlichkeit von 3% homolog zu EST in Datenbanken. Die Frequenz von 74% der isolierten flankierenden

genomischen Sequenzen mit Identitäten zu EST der Gerste indiziert somit eine Präferenz des *Ds*-basierten GTDsB-Konstrukts für exprimierte Sequenzen der Gerste. Damit liegen für zwei weitere Aspekte der Transposition von GTDsB Erkenntnisse vor, die für die Anwendung der GT-Linien relevant sind.

Die Untersuchungen zur Expression des *gus*-Reportergens von GTDsB in der GT-F2-Generation haben zum einen gezeigt, dass eine Reporteraktivität in mehr als 50% der untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden kann (4.3, S. 73). Zum anderen gibt es in 10% dieser Pflanzen Hinweise auf ein vererbbares Ereignis. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zudem, dass die Frequenz der GUS-Expression in dem hier vorgestellten *gene trap*-Ansatz im Vergleich zu Systemen mit anderen Konstrukten höher liegt. Der dafür entscheidende Faktor könnte der Einsatz des optimierten *gene trap*-Konstrukts GTDsB sein. Das 5'terminal an das *gus*-Transkript fusionierte Sequenzen isoliert werden können, wurde anhand der Isolierung von zwei *gus*-Fusionstranskripten gezeigt (4.4, S. 78). Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die etablierten und untersuchten GT-Linien für ein *gene trap*-System nutzbar sind.

Für den Einsatz der GT-Linien gibt es verschiedene Möglichkeiten. GT-Linien, in denen es Hinweise auf eine besonders hohe Transpositionsaktivität gibt, können für einen *tagging*-Ansatz, mit dem Ziel jedes Gen des Gerstengenoms mit einer GTDsB-Insertion zu versehen, genutzt werden. In dieser Population erfolgt über mehrere Generationen hinweg die Verteilung von *gene trap*-Konstrukten nach Transposition in dem Genom. Die notwendige Populationsgröße, um ausgehend von einigen wenigen GT-Linien eine *gene trap*-Insertion in der richtigen Orientierung in jedem Gen zu erhalten, hängt dabei von mehreren Faktoren, wie Transpositionsfrequenz, Anteil an ungekoppelten Transpositionen, präferentielle Integration in Gene, Anzahl der Konstrukte bzw. Position der Integrationsloci, Genomgröße bzw. Anzahl der Gene ab. Eine hohe Transpositionsfrequenz und die präferentielle Integration in codierende genomischen Sequenz, resultieren in der Reduktion der notwendigen Populationsgröße. Solche *gene trap*-Populationen können unter modifizierten Wachstumsbedingungen durchmustert werden, um z.B. Gene, die durch Infektionen oder abiotischen Stress reguliert werden zu finden (Springer 2000, zur Übersicht). Baxter-Burrell *et al.* (2003) zeigen in ihrem Ansatz nach Sundaesan *et al.* (1995) in *Arabidopsis* wie mit *gene trap*- und *enhancer trap*-Linien effizient Gene identifiziert werden können, die im Zusammenhang mit Sauerstoffstress reguliert werden. Sie haben dafür *Arabidopsis*-Pflanzen mit transponierten *gene trap*- oder *enhancer trap*-Konstrukten unter Sauerstoffmangel kultiviert und anschließend histochemisch auf Aktivität der β -Glukuronidase untersucht. Eine weitaus interessantere Strategie, die auf viel kleinere Populationen angewendet werden kann, ist die lokale Insertionsmutagenese. Für diese Strategie muss die chromosomale Position des *gene trap*-Konstrukts zunächst genetisch kartiert werden. GT-Linien mit GTDsB-Insertionen in interessanten Genombereichen können für eine lokale Mutagenese genutzt werden. Dabei ist die Eigenschaft der *Ac*-Elemente mit einer hohen Frequenz in Positionen, die sich in enger Nachbarschaft zu den Donorstellen befinden, zu integrieren (Kunze 1996, zur Übersicht) von Vorteil.

5 Zusammenfassung

Eine effektive Strategie für die Verknüpfung von Gensequenzen mit der biologischen Funktion der Genprodukte ist die Insertionsmutagenese. Dabei integriert eine bekannte Sequenz in ein Gen und verändert dadurch die Genstruktur. Die Folge kann eine Veränderung der Genfunktion sein, die bestenfalls zu einem detektierbaren veränderten Phänotyp bei der Pflanze führt. Eine systematische Analyse von *knock out*-Mutanten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hat demonstriert, dass ein signifikanter Teil der Mutationen nicht zu detektierbaren phänotypischen Veränderungen führt (Ross-Macdonald 2000). Es wird geschätzt, dass in Hefe 60-70% der Gene nach einer Insertionsmutagenese keinen mutanten Phänotyp zeigen (Goebel und Petes 1986, Oliver *et al.* 1992, Burns *et al.* 1994). Hier bietet der Einsatz von *gene trap*-Konstrukten als Insertionsmutagene eine wertvolle Alternative. Diese Konstrukte verfügen über ein Reporter-gen, dessen Expression von der Transkription des chromosomalen Gens abhängt, in welches das Konstrukt inseriert ist. Dafür verfügt das *gene trap*-Konstrukt über spezielle Funktionseinheiten: Spleißdonorstellen, Spleißakzeptorstellen und weiteren Intronsequenzen, die für die effektive Erkennung der Spleißakzeptorsequenzen notwendig sind. Diese erlauben, unabhängig von der Insertion in ein Intron oder Exon, ein Verspleißen des Reporter-gen-Transkripts mit endogenen exprimierten Sequenzen, so dass über ein Fusionstranskript das Reporter-gen-Produkt entsteht (Abb.1). Bergmann und Lütticke (2004) konnten ein *gene trap*-Konstrukt entwickeln in dem die Effizienz des Verspleißens des Reporter-gen-Transkripts mit endogen exprimierten Sequenzen für monokotyledone Pflanzen optimiert wurde. Das als GTDsB (*gene trap Ds B*) bezeichnete Konstrukt basiert auf dem nicht-autonomen Transposon *Ds* aus Mais und wurde in dieser Arbeit erstmalig zur Etablierung von *gene trap*-Linien in Gerste eingesetzt. Die Nutzung von Transposons für die Verteilung der *gene trap*-Konstrukte in dem Genom ist gerade in Gerste, aufgrund der geringen Gendichte (Sandhu und Gill 2002, zur Übersicht), sinnvoll. Sowohl die Transposition der gut charakterisierten *Ac/Ds*-Elemente (Koprek *et al.* 2000, Scholz *et al.* 2001), als auch die präferentielle Integration in aktive chromosomale Regionen (Cooper *et al.* 2004) sind für Gerste gezeigt worden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von *gene trap*(GT)-Linien und die Untersuchung der für das *gene trap*-System relevanten Eigenschaften der Transposition und GUS-Expression. Da mit einem Zweikomponenten-System gearbeitet wird (Abb. 4), wurden für die Herstellung der GT-Linien vier unabhängige Transposase(TPase)-exprimierende Linien und 16 unabhängige GTDsB-Linien gekreuzt, was zur Etablierung von 79 unabhängigen GT-Linien geführt hat. Die Analysen der GT-F₂-Generation wurden mit Nachkommen von 28 unabhängigen GT-Linien durchgeführt, in denen 11 GTDsB-Linien in Kombination mit mindestens zwei verschiedenen TPase-Linien präsent sind. Diese GT-Linien waren die Basis zur Bearbeitung von folgenden Fragestellungen:

1. Transponiert GTDsB in den GT-Linien und mit welcher Frequenz finden unabhängige Transpositionen statt?
2. Sind bestimmte GT-Linien aufgrund von hohen Transpositionsfrequenzen für ein *gene trap*-System besonders geeignet?

3. Erfolgt eine Expression des Reportergens in der GT-Population und wie ist diese Frequenz im Vergleich zu anderen *gene trap*-Systemen?
4. Ist eine effiziente Isolierung der 5'terminal an das *gus*-Transkript fusionierten Sequenzen möglich?

Die Fragestellungen zur Transposition von GTDsB in den GT-Linien wurden mit Southernblotanalysen untersucht. Dabei konnten in 9 von 79 (11%) analysierten Pflanzen der GT-F1-Generation und in 79 von 191 (41%) untersuchten Pflanzen der GT-F2-Generation Transpositionen detektiert werden. Damit ist die Transpositionsfrequenz im Vergleich zu den bisher für Gerste publizierten Daten von 1-2% in der F1-Generation (Koprek *et al.* 2000, Scholz *et al.* 2001) und 16% in der F2-Generation (Koprek *et al.* 2000) erhöht. Die Effizienz der Insertionsmutagenese mit GTDsB wird unter anderem von der Frequenz unabhängiger Transpositionsereignisse beeinflusst. Die dafür in der F2-Generation der GT-Linien ermittelte Frequenz von 26% (49 Ereignisse in 191 getesteten Pflanzen) entspricht den Frequenzen der gut untersuchten Systeme zur Insertionsmutagenese in Reis (Greco *et al.* 2001, Kolesnik *et al.* 2004, Enoki *et al.* 1999). Die Transposition von GTDsB konnte in 21 der 28 untersuchten GT-Linien detektiert werden, wobei alle 11 GTDsB-Parentallinien mit Transpositionsereignissen vertreten sind. In den F2-Nachkommen der 11 GTDsB-Linien variiert die Transpositionsfrequenz von 5 bis 67%. Dabei scheinen zwei Faktoren einen Einfluss auf die Transpositionsfrequenz zu haben. Der erste ist die Position der GTDsB-Integrationsloci. Der Einfluss der genomischen Position des Konstrukts auf die Transpositionsfrequenz wurde für Mais (Döring 1989, zur Übersicht) gezeigt und wird auch für heterologe Systeme (Kolesnik *et al.* 2004) diskutiert. Der zweite Faktor ist die Transposase. Für die Herstellung der GT-Linien wurden Transposase-Linien, die entweder eine Wildtyp-Transposase oder eine Transposase mit einer N-terminalen Deletion von 102 Aminosäuren exprimieren, mit GTDsB-Linien gekreuzt. Aus den Ergebnissen zur Transposition lassen sich Hinweise dafür ableiten, dass die N-terminal um 102 Aminosäuren verkürzte Transposase höhere Transpositionsfrequenzen des GTDsB-Konstrukts in Gerste induziert.

Die Expression des *gus*-Reportergens wurde mit einem histochemischen GUS-Assay an 5134 Explantaten von 141 GT-F2-Pflanzen untersucht. Um eine möglichst weitreichende Erfassung der GUS-Expression zu ermöglichen, wurden von jeder Pflanze, Blattstücke, Nodien, unbefruchtete Blüten, befruchtete Blüten, Körner und Keimlinge analysiert. Zur Unterscheidung von somatischen Ereignissen von Ereignissen, die vererbt werden können, wurden von vier der sechs Organe mindestens acht Explantate untersucht. Unter vererbbar werden Ereignisse der GUS-Expression zusammengefasst, die auf einer Transposition des GTDsB-Konstrukts basieren, die an die Nachkommen vererbt werden kann. GUS-Expression konnte in allen Organen und dort in unterschiedlichen Geweben detektiert werden. Auffällig war dabei, dass in den F3-Geweben der Körner und Keimlinge die Frequenz an GUS-Expression mit 28% und 23% höher war als in den F2-Geweben Blatt (3,5%), Nodium (14%) und Blüte (8 + 12%). In 14 der 141 analysierten Pflanzen (10%) der GT-F2-Population gibt es Hinweise auf ein vererbbares Ereignis der GUS-Expression. Diese stellen interessante Kandidaten für weitere Analysen dar. Der Vergleich der hier ermittelten Frequenz der GUS-Expression mit den Frequenzen von *gene trap*-Systemen in Reis (Chin *et al.* 1999) und *Arabidopsis* (Sundaresan *et al.* 1995) deutet auf eine sehr effiziente Expression des

GUS-Reporters hin. Der darauf Einfluss nehmende Faktor könnte der Einsatz des optimierten *gene trap*-Konstrukts GTDsB sein.

Darüber hinaus konnten von einer GTDsB-Parentallinie, in deren GT-Nachkommen GUS-Expression in den Blüten nachgewiesen worden war, mittels 5'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*, Frohman *et al.* 1988) die Sequenzen der 5'terminalen Fusionen von *gus*-Fusionstranskripten isoliert werden. In dieser Linie war das GTDsB-Konstrukt inklusive flankierender Vektorsequenzen bei der Transformation in eine genomische Position integriert, die eine Expression des Reporters vermittelt. Erste Hinweise darauf, dass das *gus*-Fusionstranskript zur Expression des Reporters in den Blüten beiträgt, sind aus dem Nachweis dieses Transkripts in den gleichen Entwicklungsstadien der Blüten in denen GUS-Expression detektiert werden konnte, entstanden.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die etablierten GT-Linien ein hohes Potential für die Anwendung in einem *gene trap*-Ansatz in Gerste haben.

6 Literatur

- Altman T., Schmidt R., Willmitzer L. (1992) Establishment of a gene tagging system in *Arabidopsis thaliana* based on the maize transposable element *Ac*. *Theor Appl Genet* 84:371-383.
- Antequera F. and Bird A.P. (1988) Unmethylated CpG islands associated with genes in higher plant DNA. *EMBO Journal* 7:2295-2299.
- Arumuganathan, K. and Earle E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter Volume* 9(3):208-218.
- Balcells L. und Coupland G. (1991) Transposons as tools for the isolation of plant genes. *Tibtech* January 9:31-36.
- Balcells L. und Coupland G. (1994) The presence of enhancers adjacent to the *Ac* promoter increases the abundance of transposase mRNA and alters the timing of *Ds* excision in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 24:789-798.
- Bancroft, I. and Dean, C. (1993) Transposition pattern of the maize element *Ds* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 134:1221-9.
- Bancroft, I., Bhatt A.M., Sjodin C., Scofield S., Jones J.D.G., Dean C. (1992) Development of an efficient two-element transposon tagging system in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 233:449-461.
- Baran G., Echt C., Bureau T., Wessler S. (1992) Molecular analysis of the maize *wx-B3* allele indicates that precise excision of the transposable *Ac* element is rare. *Genetics* 130:377-384.
- Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad Sci* 316:1194-1199.
- Becker D, Brettschneider R, Lörz H. (1994) Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *The Plant Journal*; 5: 299-307.
- Becker D., Lütticke R., Li M-g, Starlinger P. (1992) Control of excision frequency of maize transposable element *Ds* in *Petunia* Protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5552-5556.
- Bellen H.J., O'Kane C.J, Wilson C., Grossniklaus U., Pearson R.K., Gehring W.J. (1989) *P*-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev* 3 (9):1288-1300.
- Bennetzen J.L., Brown W.E., Springer P.S. (1988) The state of DNA modification within and flanking maize transposable elements. In: O. Nelson (Ed.) *Plant Transposable Elements*, Plenum, New York, 237-250.
- Bennetzen J.L. (1985) The mechanism, rate, regulation and specificity of *Mu1* transposition in maize. *Journal of Cellular Biochemistry* 9, 211.
- Bennetzen J.L., Schrick K., Springer P.S., Brown W.E., SanMiguel P. (1994) Active maize genes are unmodified and flanked by diverse classes of modified, highly repetitive DNA. *Genome* 37, 565-576.
- Bennetzen J.L. (1996) The contributions of retroelements to plant genome organization, function an evolution. *Trends Microbiol* 4:347-353.

- Bergmann C. (2000) Modifizierung des *Ac*-Transposons aus Mais zu einem *gene trap*-Element und Überprüfung des Funktionskonzeptes. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Bergmann C. (2003) Entwicklung eines *Gene-trap* Systems für monokotyle Pflanzen und Untersuchungen zu seiner Funktion in Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation, Universität Hamburg.
- Bergmann C. und Lütticke S. (2004) Analysis of splice donor and acceptor function in a novel *Ac*-based gene trap construct. *Planta* 219:876-883.
- Bier E., Vaessin H., Sheperd S., Lee K., McCall K., Barbel S., Ackerman L., Carretto R., Uemura T., Grell E. (1989) Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a *P-lacZ* vector. *Genes Dev* 3(9):1273-1287.
- 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. (2002) Splicing signals and factors in plant intron removal. *Biochem Soc Trans* 30(2):146-149.
- Brutnell T.P., Dellaporta S.L. (1994) Somatic inactivation and reactivation of *Ac* associated with changes in cytosine methylation and transposase expression. *Genetics* 138:213-225.
- Burns N. Grimwade B., Ross-Macdonald P.B., Choi E.-Y., Finberg K., Roeder G.S., Snyder M. (1994) Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 8:1087-1105.
- Chang T.T., Konzak C.F., Zadoks J.C. (1974) A decimal growth code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14:415-421.
- Chen J, Greenblatt IM, Dellaporta SL. (1987) Transposition of *Ac* from the *P* locus of maize into unreplicated chromosomal sites. *Genetics* 117: 109-116.
- Chenchik A., Zhu Y.Y., Diatchenko L., Li R., Hill J. and Siebert P.D. (1998) Generation and use of high quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*, BioTechniques Books 305-319
- Chin HG, Choe MS, Lee SH, Park SH, Koo JC, Kim NY, Lee JJ, Oh BG, Yi GH, Kim SC, Choi HC, Cho MJ, Han CD (1999) Molecular analysis of rice plants harboring an *Ac/Ds* transposable element-mediated gene trapping system. *Plant J* 19: 615-23.
- Close T.J., Wanamaker S.I., Caldo R-A., Turner A.M., Ashlock D.A., Dickerson J.A., Wing R.A., Muehlbauer G.J., Kleinhofs A., Wise R.P. (2004) A new resource for cereal genomics: 22K barley genechip comes of age. *Plant Physiology* 134:960-968.
- Cone K.C., Schmidt R.J., Burr B., Burr F. (1988) Advantages and limitations of using *Spm* as a transposon tag. In "Plant Transposable Elements" (O.E. Nelson, ed.), pp. 149-159. Plenum Press, New York.
- Cooper L.D., Marquez-Cedillo L., Singh J., Sturbaum A.K., Zhang S., Edwards V., Johnson K., Kleinhofs A., Rangel S., Carollo V., Bregitzer P., Lemaux P.G., Hayes P.M. (2004) Mapping *Ds* insertions in barley using a sequence-based approach. *Mol Gen Genet* 272:181-193.
- Coupland G, Baker B, Schell J, Starlinger P. (1988) Characterization of the maize transposable element *Ac* by internal deletions. *EMBO Journal* 7:3653-3659.

- Coupland G., Plum C., Chatterjee S., Pos, A. and Starlinger P. (1989) Sequences near the termini are required for transposition of the maize transposon *Ac* in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9385-8.
- Cresse A.D., Hulbert S.H., Brown W.E., Lucas J.R., Bennetzen J.L. (1995) *MuI*-related transposable elements of maize preferentially insert into low copy number DNA. *Genetics* 140:315-324.
- Dai Z., Gao J., An K., Lee J.M., Edwards G.E., An G. (1996) Promoter elements controlling developmental and environmental regulation of a tobacco ribosomal protein gene *L34*. *Plant Mol Biol* 32:1055-1065.
- Dai S., Heng P., Marmey P., Zhang S., Tian W., Chen S., Beachy R.N., Fauquet C. (2001) Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol Breed* 7:25-33.
- Dean, C., Sjodin, C., Page, T., Jones, J. and Lister, C. (1992) Behaviour of the maize transposable element *Ac* in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 2:69-81.
- Dooner H.K., English J., Ralston E.J., Weck E.A. (1986) Single genetic unit specifies two transpositions functions in the maize element *Activator*. *Science* 234: 210-211.
- Döring H.-P., Nelsen-Salz B., Garber R., Tillmann E. (1989) Double *Ds* elements are involved in specific chromosome breakage. *Mol Gen Genet* 219: 299-305.
- Döring, H.-P. and Starlinger, P. (1986). Molecular genetics of transposable elements in plants. *Annual Reviews in Genetics* 20:175-200.
- Dubreucq, B., Berger, N., Vincent, E., Boisson, M., Pelletier, G., Caboche, M. and Lepiniec, L. (2000) The *Arabidopsis AtEPR1* extensin-like gene is specifically expressed in endosperm during seed germination. *Plant J* 23:643-52
- Eisses J.F., Lafoe D., Scott L.-A., Weil C.F. (1997) Novel, developmentally specific control of *Ds* transposition in maize. *Mol Gen Genet* 256:158-168.
- Enoki, H., Izawa, T., Kawahara, M., Komatsu, M., Koh, S., Kyojuka, J. and Shimamoto, K. (1999) *Ac* as a tool for the functional genomics of rice. *Plant J* 19:605-13.
- Feuillet C. und Keller B. (2002) Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. *Ann Bot (Lond)* 1:3-10.
- Finnegan E.J., Taylor B.H., Dennis E.S., Peacock W.J. (1988) Transcription of the maize transposable element *Ac* in maize seedlings and in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet* 212:505-509.
- Finnegan E.J, Genger R.K., Peacock W.J., Dennis E.S. (1998) DNA methylation in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:223-247.
- Finnegan E.J, Peacock W.J., Dennis E.S. (2000) DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev* 10:217-223.
- Fridlender M., Harrison K., Jones J.D.G., Levy A.A. (1996) Repression of the *Ac*-transposase gene promoter by *Ac* transposase. *Plant J* 9(6):911-917.
- Friedrich G., Soriano P. (1991) Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 5(9):1513-1523.
- Frohman M.A. (1993) Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods in Enzymology* 218:340-356.

- Frohman M.A., Dush M.K., Martin G.R. (1988) Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8998-9002.
- Geiger M.J., Bull M., Eckels D.D. and Gorski J. (1993) amplification of complementary DNA from mRNA with unknown 5' ends by one-way polymerase chain reaction. *Methods in Enzymology* 218: 321-335.
- Gierl, A. and Saedler, H. (1992) Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Mol Biol* 19: 39-49.
- Goebel M.G., Petes T.D. (1986) Most of the yeast genomic sequences are not essential for cell growth and division. *Cell* 46(7):983-992.
- Goldsbrough A.P., Tong Y., Yoder J.I. (1996) *Lc* as a non-destructive visual reporter and transposition excision marker gene for tomato. *Plant J* 9:927-933.
- Greco R., Ouwerkerk P.B.F., de Kam R.J., Sallaud C., Favilli C., Colombo L., Guideroni E., Meijer A.H., Hoge J.H.C., Pereira A. (2003) Transpositional behaviour of an *Ac/Ds* system for reverse genetics in rice. *Theor Appl Genet* 108:10-24.
- Greco R., Ouwerkerk P.B.F., Taal A.J.C., Favilli C., Beguiristain T., Puigdomènech P., Colombo L., Hoge J.H.C., Pereira A. (2001) Early and multiple *Ac* transpositions in rice suitable for efficient insertional mutagenesis. *Plant Molecular Biology* 46: 215-227.
- Greenblatt I.M., Brink R.A. (1962) Twin mutations in medium variegated pericarp maize. *Genetics* 108: 471-485.
- Grevelding C., Becker D., Kunze R., von Menges A., Fantes V., Schell J., Masterson R. (1992) High rates of *Ac/Ds* germinal transposition in *Arabidopsis* are suitable for gene isolation by insertional mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6085-6089.
- Healy J, Corr C, DeYoung J, Baker B. (1993) Linked and unlinked transposition of a genetically marked *Dissociation* element in transgenic tomato. *Genetics* 134:571-584.
- Hehl R. and Baker B. (1989) Induced transposition of *Ds* by a stable *Ac* in crosses of transgenic tobacco plants. *Molecular and General Genetics* 217(1): 53-59.
- Hehl R., Nacken W.K.F., Krause A., Saedler H. and Sommer H. (1991) Structural analysis of *Tam3*, a transposable element from *Antirrhinum majus*, reveals homologies to the *Ac* element from maize. *Plant Molecular Biology* 16: 369-371.
- Heinlein M. (1996) Excision patterns of *Activator* (*Ac*) and *Dissociation* (*Ds*) elements in *Zea mays* L.: Implications for the regulation of Transposition. *Genetics* 144:1851-1869.
- Heinlein M., Brattig T., Kunze R. (1994) *In vivo* aggregation of maize *Activator* (*Ac*) transposase in nuclei of maize endosperm and petunia protoplasts. *Plant J* 5:705-714.
- Hiwatshi Y., Nishiyama T., Fujita T., Hasebe M. (2001) Establishment of gene-trap and enhancer-trap systems in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* 28(1):105-116.
- Honma M.A., Baker B.J., Wadell C.S. (1993) High frequency germinal transposition of *Ds-A-I-s* in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6242-6246.
- Houba-Hérin, N., Becker, D., Post, A., Larondelle, Y. and Starlinger, P. (1990) 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*. *Mol Gen Genet* 224:17-23.

- Ito T., Motohashi R., Kuromori T., Mizukado S., Sakurai T., Kanahara H, Seki M., Shinozaki K. (2002) A new resource of locally transposed *Dissociation* elements for screening gene-knockout lines *in silico* on the *Arabidopsis* genome. *Plant Physiol* 129:1695-1699.
- Izawa T., Miyazaki C., Yamamoto M., Terada R., Iida S. and Shimamoto K. (1991) Introduction and transposition of the maize transposable element *Ac* in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet* 227: 391-396.
- Izawa, T., Ohnishi, T., Nakano, T., Ishida, N., Enoki, H., Hashimoto, H., Itoh, K., Terada, R., Wu, C., Miyazaki, C., Endo, T., Iida, S. and Shimamoto, K. (1997) Transposon tagging in rice. *Plant Mol Biol* 35:219-29.
- Jähne A., Becker D., Brettschneider R., Lörz H. (1994) Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. *Theor Appl Gen* 89:525-533.
- Jarvis P, Belzile F., Dean C. (1997) Inefficient and incorrect processing of the *Ac* transposase transcript in *iae1* and wild-type *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 11(5):921-931.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6:3901-3907.
- Jefferson, R.A. (1987a). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405
- 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.K.S.I. and An G. (2000) T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J* 22:561-70.
- Jones J.D.G., Carland F.M., Maliga P., Dooner H.K. (1989) Visual detection of transposition of the maize element *Activator* (*Ac*) in tobacco seedlings. *Science* 244: 204-207.
- Joshi C.P., Zhou H., Huang X., Chiang V. L. (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol Biol* 35(6):993-1001.
- Jung K.-H., Hur J., Ryu C.-H., Choi Y., Chung Y.-Y., Miyao A., Hirochika H., An G. (2003) Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene trap system. *Plant Cell Physiol* 44(5):463-472.
- Kavanagh T.A., Jefferson R.A., Bevan M.W. (1988) Targeting a foreign protein to chloroplasts using fusions to the transit peptide of a chlorophyll a/b protein. *Mil Gen Genet* 215:38-45.
- Keller, J., Jones, J.D., Harper, E., Lim, E., Carland, F., Ralston, E.J. and Dooner, H.K. (1993) Effects of gene dosage and sequence modification on the frequency and timing of transposition of the maize element *Activator* (*Ac*) in tobacco. *Plant Mol Biol* 21:157-70.
- Keller, J., Lim, E., James DW, J.r. and Dooner, H.K. (1992) Germinal and somatic activity of the maize element *Activator* (*Ac*) in *Arabidopsis*. *Genetics* 131:449-59.
- Klimyuk V.I., Nussaume L., Harrison K., Jones J.D.G. (1995) Novel GUS expression patterns following transposition of an enhancer trap *Ds* element in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet* 249:357-365.
- Kohli A., Leech M., Vain P., Laurie D.A. und Christou P. (1998) Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration

- mechanism mediated by the establishment of integration hotspots. *Proc Natl Acad Sci* 95:7203-7208.
- Kolesnik T., Szeverenyi I., Bachmann D., Kumar C.S., Jiang S., Ramamoorthy R., Cai M., Ma Z.G., Sundaresan V. und Ramachandran S. (2004) Establishing an efficient *Ac/Ds* tagging system in rice: large-scale analysis of *Ds* flanking sequences. *The Plant Journal* 37:301-314.
- Koprek T., McElroy D, Louwarse J, Williams-Carrier R, Rangel S, Lemaux PG (2001) Transposon-mediated single-copy gene delivery leads to increased transgene expression stability in barley. *Plant Physiol* 125:1354-62.
- Koprek T., McElroy D., Louwarse J.D., Williams-Carrier R. and Lemaux P.G. (2000) Technical advance: An efficient method for dispersing *Ds* elements in the barley genome as a tool for determining gene function. *Plant J* 24:253-63.
- Koprek T., McElroy D., Louwarse J.D., Williams-Carrier R. and Lemaux P.G. (2000) Technical advance: An efficient method for dispersing *Ds* elements in the barley genome as a tool for determining gene function. *Plant J* 24:253-63.
- Kunze R., Kühn S., Jones J.D.G. and Scofield S.R. (1995) Somatic and germinal activities of maize *Activator* (*Ac*) transposase mutants in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 8:45-54.
- Kunze R., Starlinger P. (1989) The putative transposase from of transposable element *Ac* from *Zea mays* L. interacts with subterminal sequences of *Ac*. *EMBO J* 8:3177-3185.
- Kunze R., Starlinger P., Schwartz D. (1988) DNA methylation of the maize transposable element *Ac* interferes with its transcription. *Mol Gen Genet* 214:325-327.
- Kunze, R. (1996) The maize transposable element activator (*Ac*). In H. Saedler und A. Gierl (eds.) *Transposasble Elements*. *Curr Top Microbiol Immunol* 204:161-94.
- Kunze, R., Behrens, U., Courage-Franzkowiak, U., Feldmar, S., Kuhn, S. and Lutticke, R. (1993) Dominant transposition-deficient mutants of maize *Activator* (*Ac*) transposase. *Proc Natl Acad Sci* 90:7094-8.
- Kunze, R., Saedler, H. and Lönning (1997) *Plant Transposable Elements*. In: Callow, J.A., (ed.) *Advances in Botanical Research incorporating Advances in Plant Pathology*, pp. 332-470. San Diego: Academic Press.
- Kunze, R., Stochaj, U., Laufs, J. and Starlinger, P. (1987) Transcription of the transposable element *Activator* (*Ac*) of *Zea mays* L. *EMBO Journal* 6:1555-1563.
- Lindsey K., Wenbin W., Clarke M.C., McArdle H.F., Rooke L.M., Topping J.F. (1993) Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants. *Transgene Research* 2:33-47.
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF. (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* 8: 457-463.
- Lloyd A.M., Walbot V., Davis R.W. (1992) *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators *R* and *Cl*. *Science* 258:1773-1775.
- Long D., Swinburne J., Martin M., Wilson K., Sundberg E., Lee K., Coupland G. (1993) Analysis of the frequency of inheritance of transposed *Ds* elements in *Arabidopsis* after activation by a CaMV 35S promoter fusion to the *Ac* transposase gene. *Mol Gen Genet* 241:627-636.

- Maes T., De Keukeleire P. and Gerats T. (1999) Plant tagology. *Trends in Plant Science* 4(3):90-96.
- Martin D.J., Firek S., Moreau E., Draper J. (1997) Alternative processing of the maize *Ac* transcript in *Arabidopsis*. *Plant J* 11(5):933-943.
- McClintock B. (1948) Mutable genetic loci in maize. *Carnegie Inst. Wash., Year Book*; 47: 155-169.
- McClintock B. (1951) Mutable genetic loci in maize. *Carnegie Inst. Wash., Year Book*; 50: 174-181.
- McElroy D, Louwse JD, McElroy SM, Lemaux PG. (1997) Development of a simple transient assay for *Ac/Ds* activity in cells of intact barley tissue. *The Plant Journal* 11(1): 157-165.
- McElroy D., Zhang W., Cao J., Wu R. (1990) Isolation of an efficient *actin* promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* 2:163-171.
- Moore G., Devos K., Wang Z., Gale M. (1995) Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. *Curr Biol* 5:737-739.
- Müller-Neumann, M., Yoder, J.I. and Starlinger, P. (1984) The DNA sequence of the transposable element *Ac* of *Zea mays* L. *Molecular and General Genetics* 198:19-24.
- Nussaume L., Harrison K., Klimyuk V., Martienssen R., Sundaresan V, Jones J.D. (1995) Analysis of splice donor and acceptor site function in a transposable gene trap derived from the maize element *Activator*. *Mol Gen Genet* 249(1):91-101.
- O’Kane C.J., Gehring W.J. (1987) Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* 84(24):9123-9127.
- Oliver S.G., van der Aart Q.J., Agostoni-Carbone M.L., Aigle M., Alberghina L., Alexandraki D., Antoine G., Anwar R., Ballesta J.P., Benit P. *et al.* (1992) The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature* 6373:38-46.
- Parinov S., Sevugan M., De Y., Yang W.C., Kumaran M. and Sundaresan V. (1999) Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 2263-2270.
- Pohlman, R.F., Fedoroff, N.V. and Messing, J. (1984) The nucleotide sequence of the maize controlling element *Activator*. *Cell* 37:635-43.
- Raina S., Ramamurthy M., Chen F. and Fedoroff N. (2002) A collection of sequenced and mapped *Ds* transposon insertion sites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 50:93-110.
- Rommens C.M.T., Munyikwa T.R.I., Overduin B., Nijkamp H.J.J., Hille J. (1993) Transposition pattern of a modified *Ds* element in Tomato. *Plant Mol Biol* 21:1109-1119.
- Ross-Macdonald P. (2000) Functional analysis of the yeast genome. *Funct Integr Genomics* 2:99-113.
- Rostoks N., Park Y.J., Ramakrishna W., Ma J., Druka A., Shiloff B.A., SanMiguel P.J., Jiang Z., Brueggeman R., Sandhu D., Gill K., Bennetzen J.L., Kleinhofs A. (2002) Genomic sequencing reveals gene content, genomic organization, and recombination relationships in barley. *Funct Integr Genomics* 2:251-59.
- Saedler H. and Nevers P. (1985) Transposition in plants: a molecular model. *EMBO Journal*; 4: 585-590.

- Sambrook J, Fritsch ET, Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandhu D., Gill K.S. (2002) Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes. *Plant Physiol* 3:803-811.
- SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y.-K., Motchoulskaia N., Zakharov D., Melake-Berhan A., Springer P.S., Edwards K.J., Lee M., Avramova Z. *et al.* (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274:765-768.
- Schmidt R., Willmitzer L. (1989) The maize autonomous element *Activator* (*Ac*) shows a minimal germinal excision frequency of 0,2%-0,5% in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Mol Gen Genet* 220:17-24.
- Scholz S, Lörz H, Lütticke S. (2001) Transposition of the maize transposable element *Ac* in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular and General Genetics* 264: 653-661.
- Scholz S. (2000) Das *Ac*-Element aus *Zea mays* L. in Gerste (*Hordeum vulgare* L.): Nachweis der Transposition und Ansätze zur Transposon-Mutagenese. Dissertation, Universität Hamburg.
- Scofield S.R., English J.J., Jones J.D.G. (1993) High level expression of the *Activator* transposase gene inhibits the excision of *Dissociation* in tobacco cotyledons. *Cell* 75(5): 507-517.
- Scofield S.R., Harrison K., Nurrish S.H., Jones J.D.G. (1992) Promoter fusions to the *Activator* Transposase gene cause distinct patterns of *Dissociation* excision in tobacco cotyledons. *Plant Cell* 4:573-582.
- Scortecci K.C., Raina R., Fedoroff N.V., Van Sluys M.-A. (1999) Negative effect of the 5'-untranslated leader sequence on *Ac* transposon promoter expression. *Plant Mol Biol* 40:935-944.
- Shepherd N.S., Schwarz-Sommer Z., Wienand U., Sommer H., Deumling B., Peterson P.A. and Saedler H. (1982) Cloning of a genomic fragment carrying the insertion element *Cin1* of *Zea mays*. *Mol Gen Genet* 188: 266-271.
- Simpson C.G., Hedley P.E., Watters J.A., Clark G.P., McQuade C., Machray G.C., Brown J.W. (2000) requirements for mini-exon inclusion in potato invertase mRNAs provides evidence for exon-scanning interactions in plants. *RNA* 6(3):422-433.
- Simpson C.G., Thow G., Clark G.P., Jennings S.N., Watters J.A., Brown J.W. (2002) Mutational analysis of a plant branchpoint and polypyrimidine tract required for constitutive splicing of a mini-exon. *RNA* 8(1):47-56.
- Simpson G.G. and Filipowicz W. (1996) Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. *Plant Molecular Biology* 32: 1-41.
- Smith CW, Chu TT, Nadal-Ginard B. (1993) Scanning and competition between AGs are involved in 3' splice site selection in mammalian introns. *Mol Cell Biol* 13:4939-4952.
- Smith D., Yanai Y., Liu Y.-G., Ishiguro S., Okada K., Shibata D., Whittier R.F., Fedoroff N.V. (1996) Characterization and mapping of *Ds*-Gus-T-DNA lines for targeted insertional mutagenesis. *Plant J* 10: 721-732.
- Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517.

- Spickernagel R. (1999) Untersuchungen zur Beeinflussung von Positionseffekten durch ein heterologes SAR-Element in Gerste (*Hordeum vulgare* L.), Dissertation, Universität Hamburg.
- Springer P.S. (2000) Gene traps: Tools for Plant Development and Genomics. *The Plant Cell* 12: 1007-1020.
- Springer P.S., Edwards K.J. and Bennetzen J.L. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 863-867.
- Sundaresan V., Springer P., Volpe T., Haward S., Jones J.D.G., Dean C., Ma H. und Martienssen R. (1995) Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development* 9:1797-1810.
- Swinburne J., Balcells L., Scofield S.R., Jones J.D.G., Couplabd G. (1992) Elevated levels of *Activator* Transposase are associated with high frequencies of dissociation excision in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4:583-595.
- Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant Journal* 11:1369-1376.
- Van Sluys M.A., Tempe J., Fedoroff N.V. (1987) Studies on the introduction and mobility of the maize *Activator* element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*. *EMBO J* 6: 3881-3889.
- Wan Y., Lemaux P.G. (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol* 104:37-48.
- Wang L., Kunze R. (1998) Transposase binding site methylation in the epigenetically inactivated *Ac* derivative *Ds-cy*. *Plant J* 13(4):577-582.
- Wannamaker S., Close T. (2003) HarvEST: Triticeae. Release 0.99 (available at <http://138.23.191.152:/blast.blast.html>).
- Wessler S.R. (1991) Alternative splicing of a *Ds* element from exon sequences may account for two forms of *wx* protein encoded by the *wx-m9* allele. *Maydica* 36:317-322.
- Wessler S.R., Baran G., Varagona M. (1987) The maize transposable element *Ds* is spliced from RNA. *Science* 237:916-918.
- White S.E., Habera L.F. and Wessler S.R. (1994) Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for copia-like elements in the evolution of gene structure and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11792-11796.
- Wilson C., Pearson R.K., Bellen H.J., O'Kane C.J., Grossniklaus U., Gehring W.J. (1989) *P*-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes Dev* 3(9):1301-1313.
- Wu C., Li X., Yuan W., Chen G., Kilian A., Li J., Xu C., Li X., Zhou D.-X., Wang S., Zhang Q. (2003) Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *The Plant Journal* 35:418-427.
- Yamazaki M., Tsugawa H., Miyao A., Yano M., Wu J., Yamamoto S., Matsumoto T., Sasaki T., Hirochika H. (2001) The rice retrotransposon Tos17 prefers low-copy-number sequences as integration targets. *Mol Gen Genet* 265:336-344.

- Yoshioka Y., Kurei S., Machida Y. (2001) Identification of a monofunctional aspartate kinase gene of *Arabidopsis thaliana* with spatially and temporally regulated expression. *Genes Genet Syst* 76:189-198.
- Yu Y., Tomkins J.P., Waugh R., Frisch D.A., Kudrna D., Kleinhofs A., Brueggeman R.S., Muehlbauer G.J., Wise R.P., Wing R.A. (2000) A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. *Theor Appl Genet* 101:1093-1099.

Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ac	'Activator', autonomes transponierbares Element aus Mais
amp	Ampicillin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'- (5'-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl)-Phenylphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Ds	'Dissociation', nicht-autonomes transponierbares Element aus Mais
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
F	Filialgeneration
G	Guanin
GAPDH	glykolytische Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GSP	genspezifischer Primer
GT	<i>gene trap</i>
GUS	β-Glukuronidase
<i>gus</i>	<i>uidA</i> oder <i>gusA</i> , Gen für die β-Glukuronidase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N-terminal	aminoterminal
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Parentalgeneration
PCR	Polymerasekettenreaktion
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
Seq	Sequenz
SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>
T	Thymin
T0	direktes, transgenes Pflanzenregenerat
Tab.	Tabelle
TIR	<i>terminal inverted repeat</i>
TPase	Transposase
TSD	<i>target site duplication</i>
U	Uracil
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-Glucuronsäure

ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

Einheiten

°C	Grad Celsius	
bp	Basenpaare	
g	Gramm	
h	Stunde	
J	Joule	
kb	Kilobasen	
l	Liter	
m	Meter	
M	molar, mol/l	
Mb	Megabasen	
min	Minute	
Pa	Pascal, 1 Pa = 1,45x 10 ⁻⁴ psi	
psi	<i>pounds per square inch</i>	
rpm	Umdrehungen pro Minute	
U	<i>units</i>	
v	Volumen	
w	Gewicht	
sec	Sekunde	
k	kilo-	10 ³
m	milli-	10 ⁻³
μ	mikro-	10 ⁻⁶
n	nano-	10 ⁻⁹
p	pico	10 ⁻¹²

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2003 bis Dezember 2005 am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg, Abteilung Entwicklungsbiologie und Biotechnologie angefertigt. Die Promotion wurde über den Zeitraum von zwei Jahren und drei Monaten von der Studienstiftung des Deutschen Volkes gefördert.

Mein Dank gilt allen, die mich während dieser Zeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Lörz danke ich für die Bereitstellung des Themas und Arbeitsplatzes sowie für die wissenschaftliche Begutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Udo Wienand danke ich für die Bereitschaft die vorliegende Arbeit als Gutachter zu bewerten.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Stephanie Lütticke für die intensive wissenschaftliche Betreuung, ihre konstruktiven Anregungen und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Maike Andermann, Sabine Grünberg, Bärbel Hagemann und Sabina Miaskowska danke ich für die technische Unterstützung. Celia K. Friedrich, Dr. Maram Girgi und Dr. Stefan Scholten danke ich für den wissenschaftlichen Austausch. Dr. Sandra Kerbach danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Entwicklungsbiologie und Biotechnologie für die Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.