

**Untersuchungen zur Expression
der *Ac*-Transposase aus Mais (*Zea mays* L.)
in Gerste (*Hordeum vulgare* L.)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
am Department Biologie der
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Universität Hamburg

eingereicht von
Dipl. Biochem. Celia Katharina Friedrich

Hamburg, im Juli 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. H. LÖRZ
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. U. WIENAND
Tag der Disputation: 21. September 2007

Hamburg, den 07. September 2007



A handwritten signature in black ink, consisting of a large 'R' followed by a cursive 'L' and a long horizontal stroke.

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien und Lösungen.....	15
2.2 Molekularbiologische Reagenzien.....	15
2.2.1 Enzyme.....	15
2.2.2 Größenstandards.....	16
2.3 Klonierungs- und Transformationsvektoren.....	17
2.4 Pflanzenmaterial.....	19
2.4.1 Gerste.....	19
2.4.2 Mais.....	21
2.5 Analysesoftware.....	22
2.6 Geräte.....	23
2.7 Durchflusszytometrische Ploidiebestimmung.....	23
2.8 Isolierung genomischer Pflanzen-DNA.....	23
2.8.1 Lösungen für die Isolierung von Nukleinsäuren.....	24
2.9 Restriktion genomischer DNA.....	25
2.10 Präzipitation von DNA.....	25
2.10.1 Ethanol-Präzipitation kleiner DNA-Mengen.....	25
2.10.2 Isopropanol-Präzipitation genomischer DNA.....	26
2.11 RNA-Isolierung.....	26
2.12 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	28
2.13 In vitro-Transkription.....	28
2.14 Reverse Transkription von mRNA / RT-PCR.....	29
2.15 PCR Methoden.....	30
2.15.1 Primer.....	31
2.15.2 Sonden.....	34
2.16 Klonierung von PCR-Fragmenten.....	35
2.17 Klonierung des Transformationskonstruktes pUbi::mDs::GUS.....	35
2.18 Bakterienkultur.....	36
2.18.1 Medien für die Bakterienkultur.....	37

2.19	Plasmid-Präparation.....	38
2.19.1	Plasmidpräparation mittels Genelute [®] Mini-Prep Kit.....	38
2.19.2	Plasmidpräparation nach der 1-2-3-Methode.....	38
2.20	Gelelektrophorese.....	39
2.20.1	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	40
2.20.1.1	Lösungen für die Gelelektrophorese.....	40
2.20.2	Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese von RNA.....	40
2.21	Transfer von DNA auf eine Membran (Southernblotting).....	41
2.21.1	Lösungen für Southernblotting und Northernblotting.....	42
2.22	Transfer von RNA auf eine Membran (Northernblotting).....	44
2.23	Hybridisierung und chemiluminographischer Nachweis.....	45
2.24	Isolierung und Kultivierung von Gerstenmikrosporen.....	47
2.24.1	Lösungen für die Isolierung von Gerstenmikrosporen.....	49
2.24.2	Medien für die Gewebekultur von Gerstenmikrosporen.....	49
2.25	Isolierung und Kultivierung von Gerstenskutelli.....	51
2.25.1	Medien für die Gewebekultur von Gerstenskutelli.....	52
2.26	Biolistische Transformation von Gerstenskutelli.....	53
2.27	Histochemischer β -Glucuronidase-Aktivitätstest.....	54
2.27.1	Lösungen für den β -Glucuronidase-Aktivitätstest.....	55
2.28	Berechnung der <i>Ac</i> -Transposase-Menge.....	55
3.	Ergebnisse.....	57
3.1	Charakterisierung der Ploidie von <i>Ac</i> -Transposase-Gerstenlinien.....	57
3.1.1	Versuche zur Regeneration von doppelhaploiden <i>Ac</i> -Transposase-Gerstenpflanzen.....	58
3.1.2	Nachweis des Ploidiegrads von <i>Ac</i> -Transposase-Gerstenpflanzen aus Mikrosporenkultur.....	62
3.1.3	Überprüfung der Doppelhaploidität mittels eines PCR-basierten <i>Ac</i> -Schnelltests.....	65
3.2	Analyse der transgenen <i>Ac</i> -Transposase-Genorte in Gerste.....	68
3.2.1	Überprüfung des cw <i>Ac</i> -Konstrukttyps und dessen Immobilisierung in transgenen Gerstenlinien.....	68
3.2.2	Bestimmung der Anzahl ins Gerstengenom integrierter <i>Ac</i> -, <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ - und <i>UbiAc</i> -Elementkopien.....	70

3.2.3	Bestimmung der Vollständigkeit der ins Gerstengenom integrierten <i>Ac</i> - und <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ -Elementkopien.....	78
3.2.4	Analyse der <i>Ac</i> -Transgenweitergabe in Gerstenlinien.....	80
3.3	Untersuchung der Transkription und Transkriptprozessierung von <i>Ac</i> -Transposase in Gerste.....	87
3.3.1	Amplifikation von <i>Ac</i> -Transkripten aus Gerste und Mais.....	88
3.3.2	Sequenzanalyse der klonierten <i>Ac</i> -Transkriptfragmente.....	92
3.4	Aktivität der <i>Ac</i> -Transposase in Gerste.....	96
3.4.1	Optimierung von semi-transienten Tests zur indirekten Messung der <i>Ac</i> -Transposase-Aktivität in Gerste.....	97
3.4.2	Standardisierung von Gewebeproben für semi-transiente Tests.....	100
3.4.3	Semi-transiente Tests der <i>Ac</i> -Transposase-Aktivität an <i>Ac</i> -, <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ - und <i>UbiAc</i> -Gerstenlinien.....	103
3.4.4	Auswertung von einzelnen Skutellumproben der heterozygoten Linien <i>cwAc</i> #3 und <i>cwAc</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #7.....	105
4.	Diskussion	108
4.1	Nachweis stabiler , teilweise doppelhaploider <i>Ac</i> -, <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ - und <i>UbiAc</i> -Gerstenlinien mit immobilisierten Transposons.....	110
4.2	Dosiseffekt und Regulation von <i>Ac</i> in Gerste im Vergleich zu anderen Organismen.....	112
4.3	Generation von doppelhaploiden Gerstenlinien durch Mikrosporenkultur.....	118
4.4	Spleißeffekte von <i>Ac</i> in Gerste.....	121
4.5	Methodische Vorteile und Grenzen des ' <i>Transposon-Tagging</i> '-Ansatzes.....	127
4.6	Ausblick.....	130
5.	Zusammenfassung	131
	Summary	133
6.	Literaturverzeichnis	135

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ac	'Activator', autonomes transponierbares Element aus Mais
cwAc ₁₀₃₋₈₀₇	modifiziertes autonomes Element Ac
Amp	Ampicillin
BAP	6-Benzylaminopurin
C	Cytosin
cw	'clipped wing'
cDNA	komplementäre DNA
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl)-Phenylphosphat
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyessigsäure
DAPI	4',6-Diamino-2-phenolindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ds	'Dissociation', nicht-autonomes transponierbares Element aus Mais
ds	doppelsträngig
dYT	double Yeast-Tryptone Medium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDA	Fluoreszeindiazetat
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GP	Gerstenkultivar, 'Golden Promise'
GUS	β-Glucuronidase
L.	Linné
MES	[2-N-morpholino]ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure

<i>mDs</i>	mutiertes <i>Ds</i>
mRNA	messenger (Boten) RNA
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysis
PCR	Polymerasekettenreaktion
PL	Kulturmedium nach Wan und Lemaux
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Aggregatzustand fest (solidus)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrate
T	Thymin
T ₀	transgenes Pflanzenregenerat aus einem Transformationsansatz
T ₁ , T ₂	Pflanzengenerationen aus der Selbstung der vorherigen Generation
Tab.	Tabelle
T _m	Schmelzpunkt, Annealingtemperatur bei Primern
TPase	Transposase
<i>uidA</i>	β-Glucuronidase-Gen
UV	ultraviolett
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-Glucuronsäure

Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
d	Tag
Da	Dalton, 1 Da = $1,66 \times 10^{-24}$ g
g	Gramm
h	Stunde
J	Joule
kb	Kilobasen(paare)
l	Liter
m	Meter
M	molar, mol/l
Min.	Minute
nt	Nukleotide
Pa	Pascal, 1 Pa = $1,45 \times 10^{-4}$ psi
psi	pounds per square inch
rpm	Umdrehungen pro Minute
Sek.	Sekunde
U	units
V	Volt
v	Volumen
w	Gewicht

Größenordnungen

k	kilo-	10^3
m	milli-	10^{-3}
μ	mikro-	10^{-6}
n	nano-	10^{-9}
p	pico-	10^{-12}
f	femto-	10^{-15}

1. Einleitung

Transponierbare Elemente, auch Transposons genannt, sind bewegliche funktionelle Einheiten des Genoms. Sie können ihre physikalische Position innerhalb eines Chromosoms verändern bzw. auf andere Chromosomen transponieren (Reviews: Fedoroff 1989, Kunze *et al.* 1997).

Für die Transposition brauchen transponierbare Elemente eine *trans*-aktive Transposase sowie *cis*-determinante ‚Terminal Inverted Repeats‘ (*TIR*) und subterminale Sequenzmotive (Abbildung 1). Während der Transposition interagiert die Transposase mit den *cis*-Determinanten des transponierbaren Elements. Der teilweise Verlust der *cis*-Determinanten führt zur Immobilisierung des Elements (Healy *et al.* 1993).

Die erste entdeckte und untersuchte Familie von transponierbaren Elementen ist die ‚Activator/Dissociation‘-Elementfamilie (*Ac/Ds*) aus Mais (*Zea mays* L., McClintock 1947). Das Wildtyp-*Ac*-Element ist 4565 Basenpaare lang (Müller-Neumann *et al.* 1984, Pohlmann *et al.* 1984). Es besitzt an den 5'- und 3'-Enden 11 Basenpaare *TIR* und 240 Basenpaare subterminale Sequenzen (Kunze *et al.* 1997). Diese *TIR* sind bei *Ac* spiegelverkehrte Wiederholungen der Sequenz C/TAGGGATGAAA. Die Deletion oder Veränderung weniger Basen dieser *TIR*-Sequenz reichen aus, um das Transposon zu immobilisieren (Kunze und Starlinger 1989, Bravo-Angel *et al.* 1995, Chatterjee und Starlinger 1995, Becker und Kunze 1997, Kunze *et al.* 1997). Beispielsweise wird *Ac* durch eine Deletion der fünf äußeren Basen der 5'-*TIR* (Healy *et al.* 1993) oder der vier äußeren Basen der 3'-*TIR* (Hehl und Baker 1989) immobilisiert. Ebenfalls eine wichtige Rolle spielen beim transponierbaren Element *Ac* die nicht-identischen subterminalen Sequenzen von circa 240 Basen an beiden Enden des Elements. Die subterminalen Sequenzen enthalten mehrere direkte und invertierte Wiederholungen der Sequenz AAACGG (Kunze und Starlinger 1989) bzw. A/TCGG (Becker und Kunze 1997). Das von den internen Sequenzen des *Ac*-Elements kodierte Protein Transposase bindet an die AAACGG-Motive in den subterminalen Sequenzen des Elements (Kunze und Starlinger 1989). Einzelne dieser Motive können jedoch ohne Funktionsverlust des ganzen Elements deletiert werden (Chatterjee und Starlinger 1995). Das Transposase-Enzym reicht aus, um *Ds*-Elemente in transgenen Pflanzen zur Transposition zu veranlassen (Coupland *et al.* 1988).

Das *Ac*-Transposase-Gen besteht aus 4 Introns und 5 Exons, die für ein Protein von 807 Aminosäuren kodieren. Die gespleißte Transposase-mRNA hat eine Länge von 3,5 Kilobasen und beinhaltet am 5'-Ende einen 650 Basenpaare langen untranslatierten ‚Leader‘ (5'-UTL,

Kunze *et al.* 1987). Dieser 5'-UTL ist in Tabak (*Nicotiana tabacum*) für die Expression nicht erforderlich (Coupland *et al.* 1988). Hypermethylierung der Leadersequenz kann jedoch in Tabak zu verringerter Expression der *Ac*-Transposase führen (Scortecci *et al.* 1999).

Der Promotor des Transposase-Gens überlappt mit den für die Transposase-Bindung wichtigen subterminalen Sequenzen der *cis*-Determinanten am 5'-Ende des *Ac*-Elements. Unabhängig von der 5'-UTL-Sequenz kann die *Ac*-Transposase durch Bindung an spezifische Bindungsstellen im *Ac*-Promotor zur Unterdrückung der Expression in Tabak (*Nicotiana tabacum*) führen (Fridlender *et al.* 1996). Methylierung des *Ac*-Promotors kann ebenfalls zur epigenetischen Inaktivierung der Expression von *Ac*-Transposase führen (Wang *et al.* 1996, Wang und Kunze 1998). Der *Ac*-Promotor hat keine konventionelle TATA-Box, sondern die das 'TATA-Binding-Protein' bindende Sequenz TAAGAAATA (Fridlender *et al.* 1998) 30 Basen vor dem Transkriptionsstart. Für eine minimale Transkription des Transposase-Gens reichen die 70 Basen vor dem Transkriptionsstart aus. Ein Promotorfragment, das aus den 109 Basen vor dem Transkriptionsstart besteht, hat eine gegenüber dem vollständigen 334-Basenpaar-Wildtyp-Promotor erhöhte Aktivität (Fridlender *et al.* 1998).

*Ac*₁₀₃₋₈₀₇-ist ein von *Ac* abgeleitetes transponierbares Element, bei dem 412 Basenpaare deletiert wurden (Kunze *et al.* 1995) und das zusätzlich durch die Deletion von 5 bp aus den 11 bp der 5'-TIR (Healy *et al.* 1993) immobilisiert wurde. Dem Element cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇ fehlt ein Teil der 5'-UTL-Sequenz und es kodiert eine N-terminal um 102 Aminosäuren verkürzte Transposase unter der Kontrolle des eigenen Promotors.

Tabelle 1: Übersicht über Position und Größe der Exons und Introns in *Ac*- und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇

	Position in <i>Ac</i> *	Größe in bp	Position in <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇	Größe in bp
5'-UTL	334-987	654	334-984	651
Exon 1**	988-1111	124	-	-
Intron 1	1112-1219	108	-	-
Exon 2	1220-2566	1246	985-2150 (1400-2566)	1166
Intron 2	2567-2637	71	2151-2221	71
Exon 3	2638-3434	796	2222-3018	796
Intron 3	3435-3523	89	3019-3107	89
Exon 4	3524-3615	91	3108-3199	91
Intron 4	3616-4002	387	3200-3586	387
Exon 5	4003-4065	62	3587-3649	62
3'-UTR	4066-4300	234	3650-3884	234

* nach Kunze *et al.* 1987

** Untranslatiertes Exon

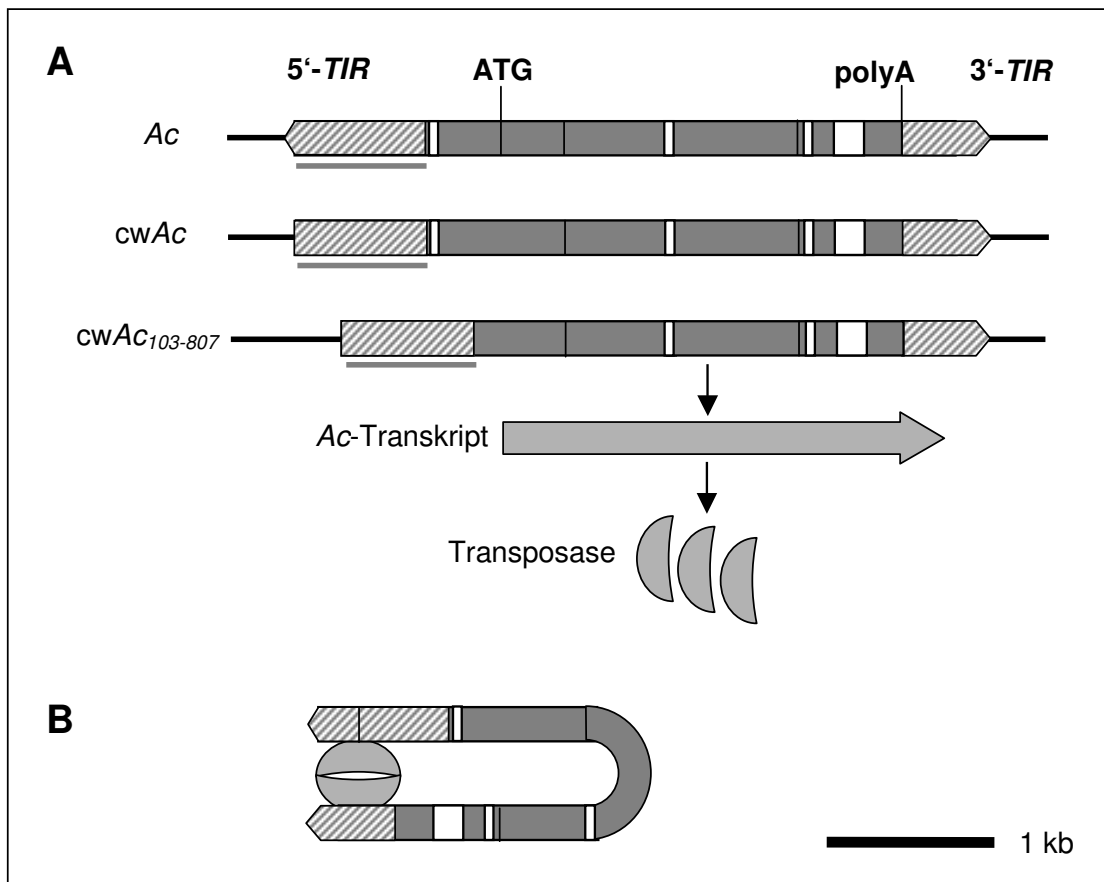


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Elemente *Ac* und *cwAc₁₀₃₋₈₀₇*

A) Die grauen Balken repräsentieren das 4565 Basenpaare lange *Ac*-, das 4560 Basenpaare lange *cwAc*- und das 4148 Basenpaare lange *cwAc₁₀₃₋₈₀₇*-Element. Weiße Boxen symbolisieren die Introns des Transposasegens. Schraffierte Bereiche stellen die etwa 240 Basenpaare langen subterminalen Sequenzen dar, am 5'-Ende befinden sich nur 6 Basen *TIR*. Der grau unterstrichene Bereich repräsentiert den Promotor. Der Promotor des Gens überlappt am 5'-Ende mit den subterminalen Sequenzen. Am 3'-Ende des Promotors befindet sich die TATA-Box circa 30 Basen vor dem Transkriptionsstart. ATG markiert den Translationsstart, PolyA die Polyadenylierungssequenz. Der graue Pfeil stellt das *Ac*-Transkript dar, der Halbkreis das *Ac*-Transposase-Protein.

B) Darstellung der an die *TIR* und subterminalen Bereiche des *Ac*-Elements gebundenen *Ac*-Transposase-Moleküle.

Über die Proteinstruktur, den Funktionsmechanismus und die Regulation des Enzyms Transposase ist nur wenig bekannt, man weiß jedoch, dass die Bindung der subterminalen Transposase-Bindungsmotive von einer N-terminalen Domäne des Proteins bewirkt wird, die Aminosäure 159 bis 206 beinhaltet (Becker und Kunze 1997). Die etwa 600 C-terminalen Aminosäuren bilden eine Dimerisierungsdomäne (Kunze *et al.* 1997), die auch zur Bildung von Transposase-Aggregaten führt (Heinlein *et al.* 1994).

Bei Integration eines *Ac*-Elements in eine genomische DNA-Sequenz entstehen auf beiden Seiten des Elements 8 Basen 'Target Site Duplications' (*TSD*). Im Gegensatz zu den *TIR* sind die 8 Basenpaare langen *TSD* direkte Sequenz-Wiederholungen.

Da Transposons ihre Position im Genom verändern können, ist es möglich, dass sie in Gene integriert werden. Durch Integration eines Transposons können Gene auf den Chromosomen mehr oder weniger stark beeinflusst werden. Die Integration kann in Exons, Introns oder regulatorischen Sequenzen wie dem Promotor des Gens stattfinden. Die Effekte einer solchen Integration können die Expression des Gens einschalten, sie verstärken, abschwächen oder die Expression des Gens ganz ausschalten. Die durch die Transposons hervorgerufenen Veränderungen in der Genstruktur können aber unter Umständen auch ohne messbaren Effekt bleiben (Fedoroff 1989). Möglich ist schließlich aber auch die Entstehung von Fusionsproteinen mit vom transponierbaren Element zusätzlich eingebrachten Domänen (Kunze *et al.* 1997).

Durch transponierbare Elemente hervorgerufene Mutationen sind instabil. *Ac* kann seinen Integrationsort wieder verlassen und an einer anderen Stelle neu integriert werden. Bei Exzision des Transposons bleiben die insgesamt 16 Basen *TSD* zurück und bilden sogenannte 'Footprints' (Fedoroff 1989). Nach Exzision eines Transposons findet nicht immer eine Reversion zum Wildtyp statt (Fedoroff 1989), da die Footprints je nach Insertionsort Frameshifts verursachen können. Bei der Exzision können außerdem am Exzisionsort weitere leichte Veränderungen der ursprünglichen Sequenz eintreten. Es kann sich hierbei um Deletionen, Insertionen und die Veränderungen einzelner Basen oder kurzer Sequenzen handeln (Saedler und Nevers 1985, Coen *et al.* 1986).

Selbständig transponieren können nur autonome transponierbare Elemente wie *Ac*, da sie alle dazu notwendigen Strukturmerkmale haben, nämlich die kodierenden Sequenzen für ein *trans*-aktives Genprodukt - die Transposase - und *cis*-aktive Sequenzen, die mit diesem Genprodukt interagieren.

Nicht-autonome *Ds*-Elemente hingegen haben nur die *cis*-Determinanten und exprimieren kein funktionelles Genprodukt; daher müssen sie von einem autonomen Element aktiviert werden, um ihre Position ändern zu können; sie sind also *trans*-reaktiv.

Defekte Elemente können zwar *trans*-aktive Genprodukte exprimieren, ihnen fehlen aber funktionelle *cis*-Determinanten. Daher sind sie selbst nicht mobil.

Die vom Element kodierte *Ac*-Transposase wurde bereits in mehreren heterologen Systemen erfolgreich exprimiert und die Transposition von *Ac*- und *Ds*-Elementen nachgewiesen, so beispielsweise in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Weil und Kunze 2000), in monokotylen Pflanzen wie Gerste (*Hordeum vulgare* L., McElroy *et al.* 1997, Koprek *et al.* 2000), Reis (*Oryza sativa* L., Murai *et al.* 1991) und Weizen (*Triticum aestivum* L., Takumi 1996) und in dikotylen Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (Long *et al.* 1993), Petunie (*Petunia hybrida*, Haring *et al.* 1989), Tabak (*Nicotiana tabacum*, Baker *et al.* 1986) und Tomate (*Lycopersicon esculentum*, Belzile und Yoder 1992).

Ac wird in Gerste exprimiert und kann *Ds*-Elemente mobilisieren (Friedrich 2001, Scholz *et al.* 2001). Die dabei entdeckten Spleißvarianten (Friedrich 2001) entsprechen teilweise den in *Arabidopsis thaliana* detektierten verkürzten Transkripten (Jarvis *et al.* 1997, Martin *et al.* 1997). Das könnte bedeuten, dass einer der Mechanismen zur Regulation der Transposasemenge in der Zelle die Transkriptionsebene betrifft.

Die Fähigkeit der transponierbaren Elemente, ihre Position auch in heterologen Genomen zu verändern, kann zum ‚*Transposon Tagging*‘ genutzt werden.

Die ‚*Transposon Tagging*‘-Strategie ermöglicht die Isolierung von Genen, für die eine definierte Mutante bekannt ist. Die Insertionsmutagenese mittels Transposons kann zum Verlust der Genfunktion führen, was sich in einem erkennbaren mutanten Phänotyp manifestieren kann.

Indem beobachtete Phänotypen direkt mit einem Genort im Genom in Verbindung gebracht werden, kann die Funktion des Gens untersucht werden und das markierte Gen isoliert werden (Van der Biezen *et al.* 1994). Es stehen für solche Vorhaben etablierte PCR-Strategien wie die ‚*Amplification of Insertion Mutagenised Sites*‘ (AIMS)-PCR (Frey *et al.* 1998) zur Verfügung. Die isolierten Sequenzen des Gens können dann wiederum als Sonden für das ‚*Screening*‘ einer genomischen Bibliothek nach dem Wildtyp-Gen verwendet werden.

Das *Ac*-Element und andere transponierbare Elemente scheinen bei der Integration ins Genom eine Präferenz für kodierende Bereiche der DNA haben (Chen *et al.* 1987, Kunze *et al.* 1997). Dies hat eine große Bedeutung für die Entwicklung von ‚*Transposon-Tagging*‘-Strategien (Kunze *et al.* 1997). Die Anzahl erforderlicher Pflanzen, um beim ‚*Tagging*‘ ein bestimmtes Gen zu treffen, kann für ein bestimmtes transponierbares Element mit einer definierten Transpositionsfrequenz und einer Präferenz für bestimmte Sequenzen abgeschätzt werden (Van der Biezen *et al.* 1994). Eine Rolle bei dieser Abschätzung spielen auch die Größe des

zu untersuchenden heterologen Genoms und der Transpositionszeitpunkt, da die Transposition etwa im Vegetationspunkt, den Gameten oder der Zygote stattfinden kann. Pflanzen besitzen keine Keimbahn, sondern stattdessen Meristeme, die als dauerhaft teilungsaktive Gewebe die Bildung von Gameten übernehmen. (Raven *et al.* 1992). Mikrosporen sind haploide Vorläuferzellen des reifen Pollens und entstehen aus generativen Zellen des Apikalmeristems. Bei der Kultivierung der Mikrosporen verdoppeln diese ihren Chromosomensatz (Olsen 1991). Das entstehende Kallusgewebe ist also diploid bzw. doppelhaploid, da es zweimal den haploiden Chromosomensatz besitzt, und kann zu einer phänotypisch normalen diploiden Pflanze regenerieren. Aus der Pollenmutterzelle entstehen zunächst durch Meiose vier einkernige Mikrosporen. In einer ersten Pollenmitose erreichen die Mikrosporen ein zweikerniges Stadium und werden durch eine zweite Pollenmitose zum reifen Pollen (Raven *et al.* 1992). Anschließend kann die bei Angiospermen übliche doppelte Befruchtung stattfinden.

Eine Weiterentwicklung des ‚*Transposon Tagging*‘ mit einem autonomen Element stellt das Zwei-Komponenten-System dar. Im Zwei-Komponenten-System wird nicht nur ein Transposon, sondern es werden zwei Elemente verwendet, die jeweils unterschiedliche Strukturmerkmale eines Transposons besitzen, nämlich entweder die *cis*- oder die *trans*-aktiven Komponenten.

Bei einem ‚*Tagging*‘-System mit nur einer Komponente besteht das Risiko, dass das Transposon bei Analyse der Nachkommen-Pflanzen bereits wieder seinen Genort geändert hat und der beobachtete mutante Phänotyp nur auf einen ‚*Footprint*‘ zurückzuführen ist, der es im Gegensatz zu einem integrierten Transposon bekannter Sequenz jedoch nicht ermöglicht, das Gen zu isolieren.

Die Trennung der *cis*- und *trans*-aktiven Komponenten im System voneinander bewirkt, dass die Transposition induziert werden kann, ohne dass das Transposase-Gen selbst seine Position verändert. Ein Vorteil des Zwei-Komponenten-Systems ist, dass die Transposase stabil integriert ist und eine gleichbleibende und im Voraus charakterisierbare Aktivität gewährleistet. Durch Kreuzung von Linien mit einem nicht-mobilen Transposase-kodierenden und einem nicht-autonomen Element entstehen Nachkommen, in denen das nicht-autonome Element transponieren kann. Die neue Insertionsmutante des nicht-autonomen Elements ist nach Auskreuzen der Transposase stabil. Damit kann ausgeschlossen werden, dass der mutierte Phänotyp die Folge eines ‚*Footprint*‘ ist.

Ein auf *Ac* basierendes Zwei-Komponenten-System besteht aus einem immobilisierten bzw. stabilisierten *Ac*-Element, das Transposase produziert, und einem *Ds*-ähnlichen nicht-autonomen Element, das über *cis*-Determinanten verfügt. Das *Ds*-ähnliche Element kann zusätzlich mit Exzisions- und Insertionsmarkern gekoppelt sein, um Exzision und Integration in den transgenen Pflanzen leichter nachweisen zu können. Unterschiedliche künstliche *Ac*- und *Ds*-Elemente, in denen innere Sequenzen beispielsweise durch Markergene ersetzt wurden (Van der Biezen *et al.* 1994, McElroy *et al.* 1997), sind bereits entworfen worden.

Das mutierte nicht-autonome Element *mDs* enthält die aus *TIR* und subterminalen Sequenzen bestehenden *cis*-Determinanten. Es ist jedoch nicht direkt von einem *Ds*-Element abgeleitet, sondern von *Ac* durch *Hind*III-Restriktion und anschließende Religation unter Deletion von 1,6 Kilobasen der internen Sequenz von *Ac*, und exprimiert daher keine funktionsfähige Transposase. Das nicht-autonome Element ist zusätzlich mit einem Exzisionsmarker gekoppelt (Lütticke, Universität Hamburg, nicht veröffentlicht). Der Exzisionsmarker vereinfacht die Detektion von Zellen und Pflanzen mit erfolgreichen *mDs*-Exzisionen, ist jedoch für die Transposition und das ‚*Transposon-Tagging*‘ an sich nicht notwendig. Im Transformationskonstrukt flankieren der *Actin1*-Promotor und das *uidA*-Gen das *mDs*-Element. Nach Exzision von *mDs* kann folglich das Reportergen *uidA* unter der Kontrolle des *Actin1*-Promotors exprimiert werden und durch einen histochemischen β -Glucuronidase-Aktivitätstest nachgewiesen werden (Jefferson *et al.* 1987). Dies ermöglicht schnelle semitransiente Tests (McElroy *et al.* 1997) der Transposase-Aktivität und der *mDs*-Mobilität in Geweben.

In der vorliegenden Arbeit werden die nicht-mobilen Transposase-kodierenden Elemente *cwAc*, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ (Abbildung 1) und *UbiAc* charakterisiert. Diese Elemente sind von *Ac* abgeleitet. Die Abkürzung *cw* bezeichnet eine Verkürzung der 5'-*TIR* um 5 Basen, was zur Immobilisierung der Elemente führt (nach Healy *et al.* 1993).

Das Element *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ enthält gegenüber dem *Ac*-Wildtyp-Element eine Deletion von 412 Basenpaaren im 5'-*UTL*. Zusätzlich sind die drei Basen am 3'-Ende des untranslatierten Leaders zu ACC verändert (Hoffmann und Kunze, nicht veröffentlicht, Kunze *et al.* 1995). Das Element exprimiert eine N-terminal um 102 Aminosäuren verkürzte Transposase. In der DNA-Sequenz des Transposase-Gens fehlen das erste Exon, das erste Intron und einige Basen des zweiten Exons. Die *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Transposase zeigt im Vergleich zur Wildtyp-*Ac*-Transposase eine erhöhte Aktivität. In Petunien (*Petunia hybrida*)-Protoplasten (Houba-Hérin *et al.* 1990,

Kunze *et al.* 1993) und Tabak (*Nicotiana tabacum*, Li und Starlinger 1990, Kunze *et al.* 1995) konnte eine erhöhte Transpositionsfrequenz von *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Elementen gegenüber dem Wildtyp-*Ac* gezeigt werden. Der deletierte Bereich ist möglicherweise als 'Silencer' zu verstehen. *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ ist ebenfalls durch die Verkürzung seiner 5'-TIR von 11 auf 6 Basenpaare immobilisiert (nach Healy *et al.* 1993).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Untersuchungen zur Expression und Funktionsfähigkeit von modifizierten *Ac*-Elementen in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) mit molekularbiologischen Methoden. Die Transkriptprozessierung ist in Hinblick auf die Aktivität der *Ac*-Transposase untersucht worden.

Die Charakterisierung von mit *cwAc*, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ und *UbiAc* stabil transformierten transgenen Pflanzen ist für weitere Versuche und insbesondere für die Auswahl geeigneter transgener Linien für das 'Transposon Tagging' wichtig. Durch die Verwendung der biolistischen Transformationsmethode zum Einbringen der DNA in die Zellen sind mehrere Integrationen ins Genom von Getreidepflanzen möglich (Pawlowski und Somers 1998). Die integrierten transgenen Genorte können daher einzelne Elementkopien, Tandem- oder invertierte Wiederholungen enthalten, sie können aus Concatemeren des Transformationskonstrukts bestehen, lediglich Bruchstücke enthalten oder von genomischer DNA unterbrochen sein (Puchta *et al.* 1992, Pawlowski und Somers 1998). Es kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass alle transgenen Pflanzen auch eine intakte Elementkopie enthalten und dass alle transgenen Linien für die Tagging-Versuche geeignet sind. Außerdem sind für die Kreuzung von Gerstenlinien im Rahmen des 'Transposon Tagging' und für weitere Analysen der Funktion der Transposase in Gerste Linien nötig, die das *Ac*-Element homozygot enthalten. Da aus Mais und heterologen Systemen bekannt ist, dass die Anzahl exprimierter *Ac*-Elemente sowohl positiv als auch negativ mit der Menge und Aktivität der *Ac*-Transposase korreliert sein kann (McClintock 1948 und 1951, Heinlein und Starlinger 1991, Scofield *et al.* 1993), ist die Charakterisierung der ins Gerstengenom eingebrachten *Ac*-Elemente grundlegend für weitere Experimente.

Biochemische Prozesse werden in Organismen auf unterschiedlichen Ebenen reguliert, beispielsweise über promotor- und kontextabhängige Transkriptionsraten von Genen, alternatives Spleißen von Transkripten, transkriptendogene Halbwertszeiten, Translationsgeschwindigkeiten, Transport von Proteinen in ihre Zielkompartimente, posttranslationale chemische Modifikation, pH-abhängige Strukturumwandlungen und

diverse Wechselwirkungen mit anderen Proteinen. Bei transponierbaren Elementen spielt außer diesen komplexen Regulationsmechanismen auch eine direkte Rückkopplung eine Rolle, da es sich um Gene handelt, deren Genprodukt die Fähigkeit hat, an die eigene Gensequenz zu binden und die Transkription zu inhibieren (Fridlender *et al.* 1996) bzw. das Gen zu exzidieren und an einer anderen Stelle ins Genom zu reintegrieren (Abbildung 1B).

Um die einzelnen Stufen in der Hierarchie der Genexpression vom *Ac*-Element bis zum Transposase-Protein zu charakterisieren, stellt sich zunächst die Frage nach der Vollständigkeit der transgenen Genorte im Genom der Gerstenpflanzen. Anschließend ist auf der RNA-Ebene interessant, ob ein Transposase-Transkript produziert und korrekt gespleißt wird. Schließlich kann auf der Proteinebene die Aktivität der Transposase in den transgenen *cwAc₁₀₃₋₈₀₇*-Pflanzen indirekt über die Expression des Exzisionsmarkers des *mDs*-Elements nachgewiesen werden.

Die Isolierung von Gerstengenomen mit dem Zwei-Komponenten-System dient langfristig der Verbesserung der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) als Nutzpflanze. Gerste wird als Lebensmittel verwendet, in Form von Gerstengraupen und als Backzusatz, vor allem jedoch als Rohstoff für Malz beim Brauen und als Tierfutter.

Gerste ist diploid, ein Chromosomensatz des Gerstengenoms umfasst $3 \cdot 10^9$ Basenpaare. Für genetische Studien bedeutet Diploidität einen großen Vorteil, da die Detektion rezessiver Mutanten in einem diploiden Organismus wesentlich einfacher als in einem polyploiden Organismus ist. Es wurden in Gerste bisher keine eigenen DNA-Transposons charakterisiert. Das Einbringen von *Ac* und *Ds* in heterologe Systeme wird erst durch geeignete Transformationsmethoden ermöglicht. Für Gerste gibt es Protokolle zur stabilen biolistischen Transformation (Wan und Lemaux 1994, Jähne *et al.* 1994, Scholz *et al.* 2001) und zur Transformation durch *Agrobacterium tumefaciens*-Infektion (Tingay *et al.* 1997).

Die *trans*-Aktivierung eines *Ds*-Derivates durch eine *Ac*-Transposase in Gerste ist in transient transformierten (McElroy *et al.* 1997) und stabil transformierten Pflanzen (Koprek *et al.* 2000) gezeigt worden. Das autonome Element *Ac₁₀₃₋₈₀₇* transponiert in Gerste (Scholz *et al.* 2001).

Transgene Gerstenpflanzen mit den Komponenten *cwAc*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇*, *UbiAc* sowie den nicht-autonomen Elementen *mDs*, *GTDsA* und *GTDsB* sind bereits hergestellt und teilweise charakterisiert worden (Scholz 2000).

Der Wildtyp des transponierbaren Elements *Ac* scheint bei monokotylen Pflanzen, wie etwa in seinem Ursprungsorganismus Mais, einen negativen oder inversen Dosierungseffekt zu haben (McClintock 1950). Die Transposition wird nach dem bisherigen Verständnis beim Vorliegen von mehreren *Ac*-Kopien oder durch die Kontrolle der *Ac*-Expression durch stärkere Promotoren seltener oder verzögert hervorgerufen (McClintock 1950, Fußwinkel *et al.* 1991, Heinlein *et al.* 1994).

Aus Mais und einigen heterologen Systemen ist jedoch bekannt, dass die Anzahl exprimierter *Ac*-Elemente auch positiv mit der Menge und Aktivität der *Ac*-Transposase korreliert sein kann (McClintock 1948 und 1951, Heinlein und Starlinger 1991, Scofield *et al.* 1993). Die Transpositionsfrequenz wird nicht allein von der Transposase-Aktivität bestimmt, sondern auch die *cis*-Komponenten spielen dabei eine Rolle. Transposase katalysiert den Transpositionsvorgang, reguliert die eigene Expression durch Bindung an den *Ac*-Promotor (Fridlender *et al.* 1996) und beeinflusst den Methylierungsstatus des Promotors und der 5'- und 3'-subterminalen Sequenzen des *Ac*-Elements (Wang *et al.* 1996). Die Analyse der im Weiteren dargestellten Untersuchungsergebnisse und deren Vergleich mit Erkenntnissen in neueren Publikationen liefern jedoch ein differenzierteres Bild der Wirkungsmechanismen.

Zwar steigt in Mais die *Ac*-Transposase-Proteinmenge mit der Anzahl *Ac*-Elemente im Genom bei einem bis vier gleichen Allelen (Fußwinkel *et al.* 1991). Dabei steigen die ‚*Steady state*‘-Level von *Ac*-Transposase-mRNA und *Ac*-Transposase-Protein proportional zur *Ac*-Dosis (Kunze *et al.* 1987, Fußwinkel *et al.* 1991).

Eine Inhibition der *Ac*-Transposase-Aktivität setzt über einem bestimmten Level ein. (Heinlein 1996). Die Inhibition kann auch in der Verschiebung des Zeitpunkts der Transposition bestehen (Heinlein 1996), wobei die Akkumulation von Aggregaten der *Ac*-Transposase im Kern möglicherweise die Menge aktiver Transposase gering hält (Heinlein *et al.* 1994).

Ds-Elemente (Dooner *et al.* 1986) und *Ac*-Elemente mit methyliertem Promotor (Kunze *et al.* 1988) tragen nicht zum Dosisseffekt bei (Fußwinkel *et al.* 1991). Da eine höhere Anzahl von *Ds*-Elementen im Genom keine Verzögerung bzw. Verringerung der Frequenz bei der Transposition hervorruft, wird vermutet, dass die *Ac*-Transposase-Protein-Konzentration für diesen ‚negativen Dosierungseffekt‘ verantwortlich ist (Kunze *et al.* 1997).

Anderen Beobachtungen zufolge beeinflussen *Ac* und *Ds* jedoch beide den Dosisseffekt (Heinlein 1996). Es wurde bereits beobachtet, dass *Ds*-Elemente Transkriptfragmente produzieren, die zu den entsprechenden Proteinfragmenten translatiert werden, deren einzelne

Domänen mit der DNA-Sequenz des *Ac*-Elements oder mit anderen *Ac*-Transposasemolekülen konkurrieren könnten (Kunze und Weil 2002).

Positionseffekte spielen ebenfalls eine Rolle. Unterschiedliche Loci bzw. Expressionsumgebungen (z.B. entgegengesetzte Orientierung bei Insertion in dasselbe Gen, Entfernung zu anderen Promotoren) beeinflussen die Expression und führen so zu unterschiedlichen Dosiseffekten (Heinlein 1996).

In Petunien (*Petunia hybrida*) wird *mDs* transient von *Ac*₁₀₃₋₈₀₇ unter der Kontrolle des 2'-Promotors aus *Agrobacterium tumefaciens* öfter als durch *Ac* oder *Ac*-cDNA unter der Kontrolle desselben Promotors exzisiert (Houba-Hérin *et al.* 1990). Es besteht jedoch kein Aktivitätsunterschied zwischen *Ac* mit dem *Ac*-wt-Promotor und *Ac* mit dem *Agrobacterium tumefaciens* 2'-Promotor (Houba-Hérin *et al.* 1990). Es findet wie in Mais eine Akkumulation von Transposase-Protein in der Zelle statt, bei Verwendung stärkerer Promotoren werden mehr Aggregate gebildet, es findet aber kein proportionaler Aktivitätsanstieg statt (Heinlein *et al.* 1994).

Aus den Ergebnissen der vorgelegten Untersuchung geht hervor, dass die Anzahl *Ac*-Elemente, die mRNA-Menge, die *Ac*-Transposasemenge und deren Aktivität in Gerste bis zu einem bestimmten Niveau korrelieren; danach nimmt die *Ac*-Aktivität trotz steigender Transposasemenge ab. Dies lässt sich durch die Bildung von *Ac*-Transposase-Aggregaten erklären. *Ac*-Transposase ist in Mais aktiv, wenn mehrere Transposase-Moleküle einen transpositionsaktivierenden Komplex bilden (Kunze *et al.* 1993), größere Aggregate sind jedoch inaktiv. Dieses differenziertere Erklärungsmodell lässt sich auf andere Organismen übertragen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien werden, sofern nicht anders vermerkt, im Reinheitsgrad ‚*pro analysis*‘ verwendet und von folgenden Firmen bezogen: Biomol (Hamburg), Biorad (München), Eurogentec (Köln), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München) und Whatman-Biometra (Göttingen).

Die Herstellung allgemein gebräuchlicher molekularbiologischer Lösungen und die Anwendung von molekularbiologischen Standardmethoden erfolgt nach Sambrook *et al.* (1989).

Die Herstellung von Lösungen und Medien erfolgt mit deionisiertem Wasser (Milli-Q Water System, Millipore, Schwalbach). Lösungen und Medien werden nach Bedarf autoklaviert (20 Min., 120°C, 2×10^5 Pa) oder sterilfiltriert (Poren-Ø 0,25 µm, Schleicher und Schüll, Dassel).

2.2 Molekularbiologische Reagenzien

2.2.1 Enzyme

Restriktionsenzyme *ClaI*, *HindIII*, *PvuII*, *ScaI*, *XbaI*, *XhoI*, werden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen, *BamHI* und *PacI* von New England Biolabs (Frankfurt);

DNaseI, RNaseA und Reverse Transkriptase RevertAidTM H⁻ M-MuLV von MBI Fermentas (St. Leon-Rot);

Taq-DNA-Polymerase, PLATINUM[®]-*Taq*-DNA-Polymerase und SUPERScriptTM One-StepTM RT-PCR mit PLATINUM[®] *Taq* von Invitrogen (Karlsruhe).

2.2.2 Größenstandards

Die Bestimmung der Größen von DNA-Fragmenten in Agarose-Gelen und von RNA in Formaldehyd-Agarose-Gelen erfolgt mit den nachfolgend angegebenen Markern der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Es werden, sofern die Marker nicht die Bezeichnung ‚*ready-to-use*‘ tragen, jeweils 10% Blaumarker (2.20.1) zugegeben.

Marker Nr. 16, λ -DNA/ *Eco*130I: Dieser beinhaltet Fragmente von 19329, 7743, 6223, (4254), 3472, 2690, 1882, 1489, 925, 421 und 74 bp. Verwendet werden jeweils 0,5-1 μ g pro Geltasche.

O’RangeRuler™ 100+500 bp-Ladder ‚*ready-to-use*‘: 6000, 5500, 5000, 4500, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp. 0,5-1 μ g pro Geltasche.

GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 und 50 bp. Pro Gelbahn 0,5-1 μ g.

MassRuler™ DNA Ladder, High+Low Range Mix, ‚*ready-to-use*‘:

Der Mengenstandard hat Fragmente von 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1035, 900, 800, 600, 500, 400, 300, 200, 100 und 80 bp, deren DNA-Menge in 10 μ l entsprechend 100, 80, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 16, 100, 90, 80, 70, 60, 100, 40, 30, 20 10 und 8 ng beträgt. Aufgetragen werden insgesamt 1,029 μ g pro Geltasche.

RNA Ladder, Low Range: 1000, 800, 600, 400, 300, 200 und 100 Basen, jeweils pro Ansatz 2 μ g.

RNA-Marker 0,2-10 kb (Sigma-Aldrich, München): 10000, 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 und 200 Basen.

Bei Southernblotting-Analysen erfolgt die Bestimmung der Größen der DNA-Fragmente durch den **DIG VII-Marker** der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) mit den Fragmenten 8576, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992, 710, 492 und 359 bp. Die Konzentration beträgt 6×10^{-3} μ g/ μ l. 0,3 μ g werden jeweils aufgetragen.

2.3 Klonierungs- und Transformationsvektoren

Zur Klonierung, Transformation und Restriktion werden folgende Plasmide verwendet. Diese Plasmide enthalten alle das *amp^r*-Gen zur Selektion.

pBS-codA-Act-UbiAc (11,6 kbp) enthält das *Ac*-Transposase-Gen unter Kontrolle des *Ubiquitin1*-Promotors (Christensen *et al.* 1992) aus Mais und des *nos*-Terminators. In entgegengesetzter Orientierung befindet sich der *Actin1*-Promotor, gefolgt vom *codA*-Gen und dem 35S-Terminator. (Koprek *et al.* 1999)

pJAc (8196 bp) ist das vollständige *Ac*-Element (4114 bp *Ac*-Transposase-Gen vom Promotor bis zur Polyadenylierungsstelle) in *pBR322*. *Ac* wird am 5'-Ende flankiert von 72 bp und am 3'-Ende von 30 bp *waxy*-Gensequenz. Vor der *waxy*-Sequenz (Müller-Neumann *et al.* 1984) am 5'-Ende befinden sich 21 bp eines *SalI*-Linkers. (Yoder unveröffentlicht, Kunze *et al.* 1987)

pAcΔ102 (7788 bp) ist der Vektor *pJAc* mit einer modifizierten *Ac*-Sequenz, die eine 412 bp-Deletion (Position 988-1400, Kunze *et al.* 1995) und Veränderung der drei letzten Basen der untranslatierten Leader-Sequenz zu ACC (Position 1405 bis 1408) enthält und von kurzen Sequenzen aus der originalen Insertionsstelle im *wx-m7*-Allel (Müller-Neumann *et al.* 1984) flankiert ist. Es resultiert ein Element von 3701 bp, das eine N-terminal um 102 Aminosäuren verkürzte *Ac₁₀₃₋₈₀₇*-Transposase exprimiert. (A. Hoffmann und R. Kunze, Botanisches Institut Köln, unveröffentlicht)

pAH2 (7783 bp) entspricht *pAcΔ102* mit zusätzlicher Deletion der äußeren fünf Basen der 5'-*TIR* von *Ac*. (S. Lütticke, Universität Hamburg, nach Healy *et al.* 1993, unveröffentlicht, Scholz *et al.* 2001)

pAct/mDs/GUS (10,2 kbp) (*pAct1D-Ds*) ist ein modifizierter Vektor *pActinGUS* mit dem *mDs*-Element zwischen dem *Actin1*-Promotor und dem *uidA*-Gen. (S. Lütticke, Universität Hamburg, nicht veröffentlicht)

p <i>Actin</i> GUS	ist ein Vektor mit dem <i>Actin1</i> -Promotor, dem <i>uidA</i> -Gen (Jefferson <i>et al.</i> 1987) und dem <i>nos</i> -Terminator (McElroy <i>et al.</i> 1990).
p <i>Ubi::Ds::GUS</i> (9,4 kb)	ist ein auf p <i>Ubi</i> GUS (D. Becker, Universität Hamburg) basierendes Transformationskonstrukt mit dem m <i>Ds</i> -Element zwischen dem <i>Ubiquitin1</i> -Promotor (Christensen <i>et al.</i> 1992) und dem <i>uidA</i> -Gen (Jefferson <i>et al.</i> 1987) mit <i>nos</i> -Terminator. (C. Friedrich, Universität Hamburg)
p <i>Ubi</i> GUS	ist ein auf p <i>Ubricas</i> (Ye <i>et al.</i> 1997) basierender Vektor mit <i>uidA</i> -Gen (Jefferson <i>et al.</i> 1987) 3' vom <i>Ubiquitin1</i> -Promotor (Christensen <i>et al.</i> 1992). (D. Becker, Universität Hamburg)
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	ist ein bakterieller Klonierungsvektor für PCR-Produkte. (TOPO [®] TA Cloning Kit, Invitrogen, Karlsruhe)
pET13::10ATG	ist ein Expressionsvektor mit <i>Ac</i> -Transposase-cDNA (R. Kunze, Botanisches Institut, Köln)
p <i>BlueAc</i>	ist der Klonierungsvektor p <i>Bluescript</i> mit unvollständigem <i>Ac</i> -Transkript. (S. Lütticke, Universität Hamburg)
<i>c1</i> -sense	ist ein Vektor mit dem <i>Actin1</i> -Promotor (McElroy <i>et al.</i> 1990), dem <i>c1</i> -Gen aus <i>Zea mays</i> L. (Paz-Ares <i>et al.</i> 1987) und dem <i>nos</i> -Terminator. (V. Reddy, Universität Hamburg)
<i>r1</i> -sense	ist ein Vektor mit dem <i>Actin1</i> -Promotor (McElroy <i>et al.</i> 1990), einem <i>r1</i> -Gen aus <i>Zea mays</i> L. (Ludwig <i>et al.</i> 1989) und dem <i>nos</i> -Terminator. (V. Reddy, Universität Hamburg)

pZmGAPDHC17	ist ein Vektor mit GAPDH-Gen <i>Gpc1</i> aus Mais. (M. Block, Universität Hamburg, zur Verfügung gestellt durch D. Becker, Universität Hamburg)
pBlueGAPDH-Hv	enthält das GAPDH-Gen aus Gerste (Martin <i>et al.</i> 1989) in pBluescript (Stratagene).

2.4 Pflanzenmaterial

2.4.1 Gerste

(Scholz 2000, Scholz *et al.* 2001, Koprek *et al.* 2000)

Es stehen für die Untersuchungen Gerstenlinien mit unterschiedlichen nicht-mobilen *Ac*-Elementen (2.3) zur Verfügung. Das *Ac*-Element ist durch Deletion der ersten fünf Basen des für die Transposition wichtigen 5'-terminalen ‚*Terminal Inverted Repeat*‘ (*TIR*) immobilisiert worden. Diese 5-Basen-Deletion wird in Liniennamen als ‚*clipped wing*‘ (*cw*) bezeichnet und der *Ac*-Elementbezeichnung vorangestellt. Das verwendete *Ac*-Element *cwAc*, enthält den Wildtyp des *Ac*-Transposasegens aus Mais einschließlich seines nativen Promotors (Müller-Neumann *et al.* 1984, Pohlmann *et al.* 1984, Kunze *et al.* 1987). Das *Ac*-Element *cwAc₁₀₃₋₈₀₇* (S. Lütticke unveröffentlicht, nach Healy *et al.* 1993, Kunze *et al.* 1993) beinhaltet ein modifiziertes *Ac*-Transposasegen mit einer Deletion von 412 Basen zwischen der untranslatierten *Leader*-Sequenz und Exon 2, so dass die exprimierte Transposase N-terminal um 102 Aminosäuren verkürzt ist. Es befindet sich im *cwAc₁₀₃₋₈₀₇*-Konstrukt unter der Kontrolle des Wildtyp-*Ac*-Transposase-Promotors (Kunze *et al.* 1995, Scholz *et al.* 2001). Außerdem ist das *UbiAc*-Element verwendet worden, das die cDNA vom Wildtyp des *Ac*-Transposasegens unter der Kontrolle des *Ubiquitin1*-Promotors exprimiert (Koprek *et al.* 1999).

Verwendet werden Nachkommen der zweiten und dritten Generation von biolistisch erzeugten primär transgenen Pflanzen (Scholz 2000) und deren durch Mikrosporenkultur regenerierten doppelhaploiden oder heterozygoten Nachkommenpflanzen. Außerdem werden nicht-transgene Pflanzen der Sommergerste (*Hordeum vulgare* L.), Kultivar ‚*Golden Promise*‘ (GP), und des Wintergerstekultivars ‚*Igri*‘ verwendet.

Als Ausgangsmaterial dienen für die Mikrosporenkultur für die Linien cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2, cwAc#3, cwAc#4, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 und cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9 direkte Nachkommen der Primärtransgenen und für die Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#1 Nachkommen der zweiten Generation.

Transgene und nicht-transgene Pflanzen des Wintergerstekultivars *Igri* werden circa vier Wochen nach der Keimung für sechs bis acht Wochen bei 2°C und neun Stunden Licht (4000 Lux) vernalisiert und anschließend im Gewächshaus weiterkultiviert. Die *Igri*- und ‚*Golden Promise*‘-Pflanzen werden im Gewächshaus bei 18°C tags und 16°C nachts und 16 Stunden Licht von 23000-25000 Lux gehalten.

Die Generation einer Pflanze wird durch die Anzahl der Schrägstriche in ihrer Linienbezeichnung angegeben.

Die ‚*Golden Promise*‘-Linien cwAc#3 und cwAc#4 enthalten ein immobilisiertes *Ac*-Element unter der Kontrolle des nativen Promotors. Die Linien cwAc₁₀₃₋₈₀₇#1, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 und cwAc₁₀₃₋₈₀₇#8 enthalten statt des immobilisierten Wildtyp-*Ac*-Elements das *Ac*-Element mit dem Gen für eine N-terminal um 102 Aminosäuren deletierte *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Transposase. Die ‚*Golden Promise*‘-Linie *UbiAc* enthält die *Ac*-cDNA unter der Kontrolle des *Ubiquitin1*-Promotors im 11,6 kb großen pBS-*codA-Act-UbiAc*-Konstrukt (Koprek *et al.* 1999, Koprek *et al.* 2000). Die Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9 des Kultivars *Igri* enthält ebenfalls das Gen für die N-terminal deletierte *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Transposase unter der Kontrolle des *Ac*-Promotors.

Zur Herstellung von doppelhaploiden Gerstenpflanzen sind die Individuen cwAcMS#1/1/20, cwAcMS#1/1/21, cwAcMS#1/1/22, cwAcMS#2/7/1, cwAcMS#2/7/2, cwAcMS#2/7/3, cwAcMS#2/2/23, cwAcMS#2/2/24, cwAcMS#2/2/25, cwAcMS#2/2/26, cwAcMS#2/7/1, cwAcMS#2/7/2, cwAcMS#2/7/3, cwAcMS#3/5/1, cwAcMS#3/5/2, cwAcMS#4/1/13, cwAcMS#4/1/14, cwAcMS#4/1/15, cwAcMS#7/2/1, cwAcMS#7/2/2, cwAcMS#7/2/3, cwAcMS#7/2/5, cwAcMS#7/7/2, cwAcMS#7/7/4, cwAcMS#7/7/5, cwAcMS#7/7/6, cwAcMS#8/1/1, cwAcMS#8/1/2, cwAcMS#8/1/3, cwAcMS#8/1/6, cwAcMS#9/1/1, cwAcMS#9/1/2, cwAcMS#9/1/3, cwAcMS#9/1/4, cwAcMS#9/1/5, *UbiAcMS1*, *UbiAcMS2*, *UbiAcMS3* und *UbiAcMS4* als Mikrosporenmutterpflanzen verwendet worden.

Für die Überprüfung der Ploidie mittels Durchflusszytometrie sind folgende Primärregenerate verwendet worden: cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2-L5, cwAc#3-R2, cwAc#4-I5, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#71-O2, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72a-Z7, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72c-Z1, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a-N1, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#74-N3, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9-p1 und cw*UbiAc*#i2.

Die Restriktionsanalysen sind mit *PacI* und *BamHI* an den Pflanzen *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇MS#2/5/1, *cwAc*MS#3/4/16, *cwAc*MS#4/18/17, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇MS#7/3/5 und *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇MS#7/3/10 aus der Generation der Mikrosporenmutterpflanzen sowie *DHcwAc*₁₀₃₋₈₀₇#2/W2, *cwAc*#3/R1, *DHcwAc*#4/U1, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#74/u5, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a/Z3, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72c/Z1, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#71/O3 und *DHcwAc*₁₀₃₋₈₀₇#9/p7 aus der Generation der Regenerate durchgeführt worden.

Für die semitransienten Aktivitätstests ist Skutellumgewebe folgender Individuen verwendet worden:

#2/1, #2/2, #2/4, #2/5, #2/7, #2/9, #2/10, #3/1, #3/4, #4/1, #4/5, #4/6, #4/7, #71/3, #71/4, #71/5, #72a/6, #72a/7, #72a/8, #72a/10, #72c/1, #72c/2, #73a/1, #73a/2, #73a/3, #73a/4, #73a/8, #73a/12, #73a/16, #73b/2, #73b/3, #73b/4, #73b/5, #74/4, #74/5, #74/8, #74m/8, #74m/10, #74m/13, #9/1, #9/2, #9/3, #9/4, #9/5, #9/6, #*UbiAc*/2/20, # *UbiAc*/2/21, # *UbiAc*/2/23 und aus der zweiten Nachfolgegeneration Skutellumgewebe der Individuen #2/24/1, #2/24/2, #2/42/13, #2/42/16, #2/42/17, #2/42/18, #3/8/1, #3/8/5, #3/8/6, #3/8/7, #3/9/1, #3/20/1, #3/20/2, #3/20/3, #3/21/2, #3/21/3, #3/21/5, #3/42/10, #4/18/1, #4/18/2, #4/18/3, #4/18/4, #4/42/12, #4/42/6, #4/42/8, #71/5/4, #71/5/6, #71/5/7, #72c/4/4, #72c/4/8, #73a/3/17, #73a/3/18, #73a/3/19, #73a/3/20, #73a/3/4, #73a/3/7, #73a/24/1, #73a/24/3, #73a/24/4, #73a/24/5, #73b/5/10, #73b/5/11, #73b/5/9, #74/42/10, #74/42/2, #74/42/4, #74/42/6, #74/42/8, #91/2/2, #91/2/3, #91/2/4 und #91/2/5.

2.4.2 Mais

Die Maislinien *A188* und *PI-vv::Ac* werden als Vergleichsmaterial verwendet. Die Linie *PI-vv::Ac*#107F (Athma und Peterson 1991) und die autotetraploide Linie #N103B werden vom Maize Genetics Cooperation Stock Center (S-123 Turner Hall, 1102 S. Goodwin Ave., Urbana, Illinois, USA) bezogen.

PI-vv enthält das *vv*-Allel des *pl* (*,pericarp colour 1'*)-Gens, wobei das erste ‚v‘ für Variegation im Perikarp steht, das zweite für Variegation im Kolben (Emerson 1917). In der Linie *PI-vv::Ac* hat eine Insertion des transponierbaren Elements *Ac* in das *pl*-Gen stattgefunden (Chen *et al.* 1987). Die Pflanzen weisen ein gestreiftes Perikarp mit hellen und dunkelroten anthocyanhaltigen bzw. phlobaphenhaltigen Bereichen und bräunliche Silks auf. Teilweise treten auch vollständig dunkelrote Körner auf. In Mais kommen natürlicherweise viele *Ac*-Kopien und auch nicht-autonome *Ds*-Elemente vor, die weitgehende

Sequenzhomologien aufweisen. Daher sind die Linien per Southernblotting-Analyse (2.21) überprüft worden, sie enthalten jeweils mehrere *Ac*-Kopien (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl der *Ac*-Elemente in den verwendeten Maispflanzen

Linie	Restriktionsenzym	Anzahl detektierte Fragmente
A188	<i>Bam</i> HI	8
<i>PI-vv::Ac</i>	<i>Bam</i> HI	5
<i>PI-vv::Ac</i>	<i>Hind</i> III	10

2.5 Analysesoftware

Zur Analyse von Gelen werden verwendet:

GeneSnap InGenius BioImaging V. 6.00 © Syngene, Synoptics Ltd.

GeneTools V. 3.02a © 1998-2002 Syngene, Synoptics Ltd.

Zur Vitalitätsbestimmung von Mikrosporen:

„Viability“ V. 1.2, 1991 von A. P. Mordhorst (Hamburg)

Für die Sequenzanalyse:

Chromas V. 1.62: Technelysium (Helensvale, Queensland, Australien);

SplicePredictor: <http://bioinformatics.iastate.edu/cgi-bin/sp.cgi> (Brendel und Kleffe 1998)

DNASTAR Lasergene V. 4.00 1989-1999:

DNASTAR Inc. (USA): *Seqman*TMII

mfold: <http://bioweb.pasteur.fr/docs/softgen.html#MFOLD> (Zuker *et al.* 1999)

Dabei werden für das Aneinanderlegen homologer Sequenzen („*Alignment*“) mit dem Programm *Seqman*TMII die Parameter so eingestellt, dass sie es dem Programm ermöglichen, Lücken einer Größe bis zu 999 bp pro 1000 bp Sequenz einzufügen, falls das erforderlich für das Auffinden und Alignieren homologer Sequenzen sein sollte. Der Wert für die Negativbewertung der Länge dieser Lücken („*Gap length penalty*“) wird dabei auf ,0‘ herabgesetzt.

2.6 Geräte

Verwendet werden folgende Zentrifugen:

- Biofuge Fresco von Heraeus (Hanau),
- 3K12 von Sigma (München),
- Sigma-Zentrifuge (Rotor 11133, 100x g = 775 rpm) und
- Hettich Universal II von Hettich Zentrifugen (Tuttlingen).

2.7 Durchflusszytometrische Ploidiebestimmung

(Naimski *et al.* 1980)

Der Ploidiegrad von Pflanzenzellen wird an jungem Blattmaterial gemessen. Das gererntete Blattmaterial kann vor der Messung bis zu zwei Wochen auf feuchtem Filterpapier oder bei -70°C bis zu zwei Jahren gelagert werden. Der Aufschluss des Gewebes erfolgt durch circa einminütiges Zerhacken mit einer Rasierklinge oder einem Skalpell. Anschließend werden die Zellpartikel in 1 ml Kernextraktionspuffer aufgenommen. Ungenügend aufgeschlossenes Gewebe wird mittels Filtration durch ein Sieb mit einem Ausschlussvolumen von 50 µm entfernt. Anschließend wird mit 200 µl DAPI (4',6-Diamino-2-phenolindol Dihydrochlorid)-Färbelösung versetzt. Kernextraktionspuffer und DAPI-Färbepuffer der Serie CyStain UV Precise P sowie 50µM-Filter Celltrics™ werden von Partec (Münster) bezogen. Am Durchflusszytometer PA (Partec, Münster) werden pro Messung mindestens 500 Zellen ausgewertet. Als Kontrollmaterial dient Gerste der Kultivare ‚*Golden Promise*‘ und *Igri*.

2.8 Isolierung genomischer Pflanzen-DNA

(Pallotta *et al.* 2000)

Von jungem Blattmaterial werden circa 100 mg mit zwei Stahlkugeln in 2-ml-Reaktionsgefäßen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei 80% Leistung wird für drei Min. in einer Schwingmühle (Retsch MM2000, Haan) aufgeschlossen. Dann wird auf Eis mit 800 µl kaltem Waite-Puffer versetzt und für etwa eine Min. gevortext. Proteine werden durch Zugabe von 800 µl Phenol/Chloroform/IAA und 30 Sek. Vortexen extrahiert. Durch Zentrifugieren bei 13000 rpm für 10 Min. in einer Heraeus Biofuge (2.7) werden die wässrige und die organische Phase voneinander getrennt. Der wässrige Überstand wird einer RNase-Restriktion mit 3 µl RNase-Lösung (10 mg/ml in RNase-Puffer) für 30 Min. bei 37°C

unterworfen. Mit 100 µl 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 1 ml Isopropanol wird für 30-60 Min. auf Eis oder über Nacht bei 4°C gefällt. Es folgt eine Zentrifugation bei 15000 rpm für 30 Min. bei 4°C in einer 3K12-Sigma-Zentrifuge (2.7) mit Rotor 12154. Das Pellet wird mit 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen und für fünf Min. bei 13000 rpm und 4°C in einer Heraeus Biofuge (2.7) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet weitere zehn Sek. zentrifugiert. Ethanolreste werden vollständig entfernt und das Pellet wird maximal fünf Min. bei offenem Reaktionsgefäß getrocknet. Die DNA wird in 50 µl TE-Puffer oder sterilisiertem deionisiertem Wasser über Nacht bei 4°C gelöst.

2.8.1 Lösungen für die Isolierung von Nukleinsäuren

Waite-Puffer	100 mM Tris/HCl (pH 8.5) 100 mM NaCl 10 mM EDTA (pH 8.0)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	25:24:1 (v/v)
Chloroform/Isoamylalkohol	24:1 (v/v)
RNase-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 7.5) 15 mM NaCl
RNase-Lösung	RNase-Puffer (pH 7.5) 10 mg/ml RNase Für 15 Min. kochen und langsam abkühlen lassen. Lagerung bei -20°C.
TE	10 mM Tris/HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA (pH 8.0)

2.9 Restriktion genomischer DNA

Es werden 12 µg genomischer DNA mit 4 µl 10x Puffer und 40 U Enzym (2.2.1, 3.2) in einem Gesamtvolumen von 40 µl für mindestens zwei Stunden bei jeweils - laut Herstellerangaben - optimaler Temperatur inkubiert.

Bei Doppelrestriktionen werden nach Restriktion mit 40 U des ersten Enzyms (3.2) weitere 30 U dieses Enzyms zugegeben und weitere zwei Stunden inkubiert. Anschließend werden je nach Restriktion 70 U des zweiten Enzyms (3.2) bei geeigneter Temperatur zugegeben und über Nacht inkubiert.

Bei Enzymen mit unterschiedlichen Pufferanforderungen werden 20 µg genomische DNA mit 40 U des ersten Enzyms restringiert und nach der ersten Restriktion gefällt (2.10), die DNA wird resuspendiert und die OD₂₆₀ erneut bestimmt. Es wird anschließend mit 40 U des zweiten Enzyms über Nacht restringiert.

Von den Restriktionsansätzen werden 20 µl abgenommen und mit 2 µl Blaumarker (2.20.1) auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt.

Für Positivkontrollen werden 5 µg der Plasmide pAcΔ102 oder Act/mDs/GUS (2.3) mit jeweils 10 U Enzym unter den gleichen Bedingungen wie die genomische DNA restringiert. Die Plasmidkontrollen werden in 1:10-Schritten auf 1 pg/µl verdünnt und davon 8 pg auf das Gel aufgetragen.

2.10 Präzipitation von DNA

2.10.1 Ethanol-Präzipitation

(Shapiro 1981)

DNA in wässriger Lösung wird mit drei Volumina Ethanol und wahlweise 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) versetzt und eine Stunde bei 4°C präzipitiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 15-30 Min. bei 13500 rpm in einer Heraeus Biofuge Fresco (2.6). Nach Entfernen des Überstands wird mit einem Volumen 70%igen Ethanols gewaschen und 10 Min. zentrifugiert. Anschließend erfolgt das Lösen in sterilem deionisiertem Wasser. Diese Methode eignet sich auch für die Präzipitation kleiner DNA-Fragmente (<100 bp) und geringer Mengen (<0,1 µg) (Sambrook *et al.* 1989).

2.10.2 Isopropanol-Präzipitation genomischer DNA

Genomische DNA wird zwischen Restriktionen mit Enzymen, die unterschiedliche Puffer benötigen, gefällt und erneut gelöst.

DNA in wässriger Lösung wird mit einem Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) versetzt und eine Stunde bei 4°C präzipitiert. Anschließend erfolgt eine von 40 Min. Zentrifugation bei 15000 rpm in einer 3K12-Sigma-Zentrifuge (2.6) mit Rotor 12154. Nach Entfernen des Überstands wird mit einem Volumen 70%igen Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgt das Lösen in sterilem deionisiertem Wasser für mehrere Stunden bei 4°C.

2.11 RNA-Isolierung

Alle Geräte werden mit RNase-freier Spüllösung vorbehandelt und stets wird RNase-freies Wasser verwendet.

Zur Extraktion von mRNA werden zunächst die Gesamtnukleinsäuren aus jungem Blattgewebe mit einem nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) abgewandelten Protokoll isoliert:

Circa 100 mg junges Blattmaterial wird mit zwei Stahlkugeln in ein 2-ml-Reaktionsgefäß gegeben, in Stickstoff eingefroren und in der Schwingmühle (Retsch MM2000, Haan) für drei Min. bei 80% Leistung gründlich aufgeschlossen. Auf Eis wird mit 200 µl TRI-REAGENZ versetzt, dann die Probe aufgetaut und eine Min. gevortext. Nach Entfernung der Stahlkugeln wird die Probe für fünf Min. bei Raumtemperatur inkubiert und dann werden die Proteine mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) eine Min. lang durch Vortexen extrahiert. Alle Zentrifugationen werden bei 13000 rpm in einer Heraeus Biofuge (2.6) durchgeführt. Nach der Extraktion wird für zwei Min. bei 4°C zentrifugiert und anschließend werden mit 500 µl Isopropanol die Gesamtnukleinsäuren bei Raumtemperatur für zehn bis 15 Min. gefällt. Nach Zentrifugation für zehn Min. bei Raumtemperatur wird mit 1 ml 75%igen Ethanol gewaschen und erneut zwei Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig abgenommen, das Pellet getrocknet und in 50 µl DEPC-behandeltem sterilem deionisiertem Wasser aufgenommen. Um die Qualität der Präparation einzuschätzen, wird die RNA in einem Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt (2.20.2).

Aus der isolierten RNA wird mRNA im Mini-Maßstab mit dem Oligotex® mRNA-Isolierungs-Kit von QIAGEN (Hilden) aufgereinigt. Es wird nach den Angaben des Herstellers verfahren. Optimierungen gegenüber dem Protokoll aus dem Kit sind im folgenden Bericht über den Aufreinigungsvorgang kursiv wiedergegeben. Alle Zentrifugationen werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Bis zu 250 µg RNA werden in ein 1,5 ml Eppi gegeben und mit RNase-freiem Wasser auf 250 µl aufgefüllt. Es werden 250 µl OBBuffer und 15 µl Oligotexsuspension zugeben und durch Pipettieren oder Schnippen gut gemischt. Dann wird für drei Min. auf 70°C erhitzt und für zehn Min. bei RT stehen gelassen. Für zwei Min. wird bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig bis auf circa 50 µl abpipettiert. Das Pellet wird in 400 µl OW2-Puffer resuspendiert und auf eine kleine Oligotex-Säule in einem 1,5 ml-Eppi gegeben. Es wird für eine Min. bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säule wird in ein frisches Eppi überführt, 400 µl OW2 werden zugeben und nach Zentrifugation für eine Min. bei 13000 rpm in neues Eppi überführt. *Der OW2-Waschschritt wird wiederholt.*

20-100 µl OEBuffer (70°C) werden auf die Säule gegeben, das Pellet wird durch viermaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert, bei einer Vielzahl von Proben werden diese wieder auf den Heizblock gestellt. Anschließend wird für eine Min. bei 13000 rpm zentrifugiert. *Das Eluat wird auf 70°C erhitzt und erneut auf die Säule gegeben. Mit 20-100 µl frischem OEBuffer (70°C) wird erneut zweimal eluiert.*

Ein µg RNA wird mit einer U DNaseI (RNase-frei, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und 0,3 U RNase-Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) in 9 µl für 40 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wird 1 µl 25 mM EDTA-Lösung zugegeben und die DNase für zehn Min. bei 65°C inaktiviert. Anschließend wird mit Phenol/Chloroform extrahiert und gefällt.

Die mRNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt (Photometer von Pharmacia Biotech, Freiburg) und die isolierte mRNA anschließend bei -70°C gelagert.

RNase-freies Wasser	mit 1‰ DEPC über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert.
---------------------	--

RNase-freie Spüllösung	0,1 M Natriumhydroxid 1 mM EDTA
------------------------	------------------------------------

TRI-Reagenz	10 ml 4 M Guanidiniumthiocyanat (autoklaviert)
	352 µl 750 mM Natriumcitrat (pH 7.0, sterilfiltriert)
	528 µl 10% Sarcosyl (sterilfiltriert)
	76 µl 14,2 β-Mercaptoethanol
	1 ml 2 M Natriumazetat (pH 4.0, autoklaviert)
	10 ml Phenol (wassergesättigt, pH 4.3)
	Lagerung bei 4°C für circa zwei Monate

2.12 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von Nukleinsäureproben wird entweder photometrisch bestimmt (Photometer von Pharmacia Biotech, Freiburg) oder optisch in einem Testgel abgeschätzt.

In sterilem deionisierten Wasser 1:50 oder 1:100 verdünnte wässrige DNA-Lösungen bzw. unverdünnte wässrige RNA-Lösungen werden im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht 50 µg dsDNA bzw. 40 µg RNA.

Für die optische Abschätzung von DNA-Mengen in einem Testgel wird jeweils ein definiertes Volumen DNA in wässriger Lösung mit 10% Blaumarker (2.20.1) gegen eine Referenz bekannter Konzentration (Marker 16, 1 µg pro Bahn) (2.2.2) in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetragen und bei 60 V für 60 Min. aufgetrennt. Die Konzentration der DNA-Probe wird anhand der bekannten DNA-Menge der einzelnen Markerbanden abgeschätzt.

2.13 *In vitro*-Transkription

Zur Herstellung von RNA-Sonden und RNA-Fragmenten zur Kontrolle bei Northernblotting-Analysen wird das Plasmid *pBlueAc* (2.3) verwendet. Das Plasmid wird für die sense-Transkription mit *XhoI* und für die antisense Transkription mit *ScaI* unter Optimalbedingungen (Sambrook *et al.* 1989) für zwei Stunden bei 37°C restringiert. Die Reaktionseffizienz wird an einem Aliquot gelelektrophoretisch überprüft. Nach Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 und Ethanolpräzipitation (2.10.1) werden jeweils 1 µg der DNA mit 2 µl DIG-markiertem NTP-Mix (Roche Diagnostics, Mannheim), 2 µl Transkriptionspuffer, 1 µl RNase-Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und 2 µl T3- bzw. T7-RNA-Polymerase in einem Volumen von 20 µl für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Kontrollen mit Nukleotiden ohne DIG-Markierung werden mitgeführt. Anschließend wird für 15 Min. DNase zugegeben und diese durch Zugabe von 1/10 Volumen 0,2 M EDTA und

zehnminütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert. Die RNA-Fragmente werden mit 4 M LiCl und kaltem absoluten Ethanol für 30 Min. bei -70°C präzipitiert und anschließend für 30 Min. bei 4°C pelletiert. Die Pellets werden in deionisiertem RNase-freien Wasser aufgenommen. Es wird die optische Dichte bestimmt und die Qualität der Transkripte anhand eines Formaldehyd-Agarose-Testgels (2.20.2) überprüft. Nach Zugabe von RNase-Inhibitor werden die *in vitro*-Transkripte bei -70°C gelagert.

2.14 Reverse Transkription von mRNA und RT-PCR

Die reverse Transkription von mRNA ist mit der reversen Transkriptase RevertAid™ H⁻ M-MuLV (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt worden. Für jeden Ansatz werden 1 ng mRNA mit 20 Pikomol Oligo-dT-Primer (2.2.3) in 11 µl für fünf Min. bei 70°C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt. Es werden pro Ansatz 4 µl Reaktionspuffer, 0,1 mM dNTP-Mix, 20 U RNase-Inhibitor und 200 U reverse Transkriptase sowie deionisiertes, RNase-freies Wasser bis zu einem Volumen von 20 µl zugegeben, und jeder Ansatz wird für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion für zehn Min. bei 70°C gestoppt und auf Eis gekühlt. Die so entstandene cDNA kann direkt für PCR-Reaktionen eingesetzt werden.

Etwa 50 pg der cDNA werden per PCR mit den Primern *Int1-F* und *Int2-R* bzw. *Int2-F* und *Int4-R* bei einer Annealingtemperatur von 57°C amplifiziert, wobei in Ansätzen von 50 µl 5 µl Puffer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 1,5 µl 50 mM Magnesiumchlorid, 2 µl 10 µM Primer und 1 U PLATINUM Taq-Polymerase zugegeben werden.

Das verwendete PCR-Programm beinhaltet folgende Schritte:

1. Vordenaturierung für zwei Min. bei 95°C
2. Denaturierung für eine Min. bei 95°C
3. Annealing für 30 Sek. bei 57°C
4. Elongation für zwei Min. bei 72°C
5. Syntheseabschluss für fünf Min. bei 72°C

Die Schritte 2 bis 4 werden wiederholt. Die Anzahl der Zyklen beträgt 20 bis 30. Nach Abschluss der Reaktion werden die Proben auf 4°C gekühlt. Jeweils ein Aliquot wird mit 10% Blaumarker (2.20.1) versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel (2.2.7) aufgetrennt.

Die RT-PCR-Ansätze werden nach 20 Zyklen und Auftrennung mittels Gelelektrophorese mit Hilfe eines DNA-Mengenstandards (2.2.2) semiquantitativ ausgewertet. Nach 20 Zyklen hat

eine Amplifikation um das 2^{20} -fache stattgefunden, so dass die Ausgangsmenge durch einfache Division der Amplifikatmenge durch 2^{20} berechnet werden kann.

Als Positivkontrolle für die Intaktheit der verwendeten mRNA und zur Quantifizierung dienen das GAPDH-Gen aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.) auf dem Plasmid *pBlueGAPDH-Hv* (Martin *et al.* 1989, 2.4) und das GAPDH-Gen *Gpc1* aus Mais (*Zea mays* L.) auf dem Plasmid *pZmGAPDHC17* (Block 1997, 2.4).

2.15 PCR Methoden

Für PCR-Reaktionen werden Gradientencycler und PCR Cycler Trioblock von Biometra (Göttingen) verwendet.

Tabelle 3: Reaktionsansätze für den *Ac*-Schnelltest nach Optimierung:

Reagenzien	Mengen auf 20 μ l	Endkonzentrationen
Reaktionspuffer	2 μ l	1x
Nukleotidmix	0,4 μ l	0,8 μ M
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 μ l	1,5 mM
<i>waxy</i> -Primer (10 μ M)	0,5 μ l	0,13 μ M
<i>Ac</i> -Primer (10 μ M)	0,5 μ l	0,13 μ M
Formamid (30%)	0,5 μ l	ca. 1%
Taq-DNA-Polymerase	0,2 μ l	5 Units

Für den *Ac*-Schnelltest werden 100 ng genomische DNA als Template und die Primer *cwAH2-5* und *cwAH2-6* (2.15.1) verwendet. *Hv-waxy1* und *Hv-waxy2* dienen der Amplifizierung der internen Positivkontrolle. Das dabei entstehende *waxy*-Fragment hat eine Länge von 537 bp und das *Ac*-Fragment von circa 400 bp.

Tabelle 4: PCR-Programm für *Ac*-Schnelltests

Schritt	Temp. in °C	Zeit t in Sek.	An Schritt...	Anzahl Zyklen
1	96	180		
2	96	60		
3	55,3	90		
4	72	40	2	10
5	96	40		
6	55,3	40		
7	72	40	5	20-26
8	72	600		
9	4	-		

Für die Unterscheidung zwischen *Ac*- und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Elementen werden die *waxy*-Primer weggelassen und nur die *Ac*-spezifischen Primer *cwDs1* und *cwDs2* (2.2.3) bei einer Annealingtemperatur von 58°C verwendet.

Zur Klonierung der 5'-*TIR* werden ebenfalls die *waxy*-Primer weggelassen und stattdessen wird mit den *Ac*-Primern *pBR1* und *Ac12* (2.2.3) bei einer Annealingtemperatur von 65,8°C ein Fragment von circa 700 bp amplifiziert und anschließend in *pBluescript* kloniert (2.3) und zur Sequenzierung aufbereitet.

Anstelle von 100 ng Template-Lösung können PCR-Reaktionen auch anhand der zur Plasmidvermehrung verwendeten Bakterienkolonien durchgeführt werden, indem man diese mit einem sterilen Zahnstocher leicht ansticht und den Zahnstocher dann kurz in den vorbereiteten Reaktionsansatz taucht. Anschließend kann der Zahnstocher direkt zum Beimpfen einer 5-ml-Übernachtskultur verwendet werden.

2.15.1 Primer

Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgt entweder durch die Primerdesign-Software *PrimerSelect*TM 4.0 aus dem Software-Paket DNASTAR (2.5) oder nach der Formel von Wallace *et al.* (1979): $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{C}+\text{G})$

Für die RT-PCR werden folgende Primer verwendet:

cDNA-Synthese:

Oligo(dT): 5'-T₁₈-3' (18 nt), T_m = 70,0°C

AcRT2: 5'-AGTCTTGGGCTCTTGGCTAAC-3' (21 nt), T_m = 52,0°C

Interner Standard:

HvGAPDH-up: 5'-TTCGTCAAGCTTGTCTCGTGGTAT-3' (24 nt), T_m = 70°C

HvGAPDH-low: 5'-CAACTCGGTGCGGAAAAACAG-3' (21 nt), T_m = 64°C

ZmGAPDH-for: 5'-ACTGCCTTGCTCCCCTTGCTAA-3' (22 nt), T_m = 65°C

ZmGAPDH-rev: 5'-GGCCCCCTTCTCGATTCTGAC-3' (21 nt), T_m = 65°C

Amplifizierung von *Ac*-Transkripten:

Positionen, basierend auf wt-*Ac* (Pohlmann *et al.* 1984, Müller-Neumann *et al.* 1984).

Int1-F: 5'-ACAGAAGAGGGCAAAGAAGTG-3' (21 nt), Pos. 1490-1510, T_m = 50°C

Int2-F: 5'-ATTTGATGTTGAGGGATGCC-3' (20 nt), Pos. 2497-2516, T_m = 51°C

Int2-R: 5'-GTCTTTGGAGCTGAAGGACTAC-3' (22 nt), P. 3039-3060, T_m = 49°C

Int4-R: 5'-CACTTGCTCACATCTGGATCA-3' (21 nt), Pos. 4127-4147, T_m = 51°C

Die Sequenz der Primer *Int1-F*, *Int2-F*, *Int2-R* und *Int4-R* ist der Literatur (Jarvis *et al.* 1997) entnommen. Der Primer *T7QL* ist eine modifizierte Version des *T7-Promotor*-Primers (pers. Mitteilung von S. Scholten 2004).

Die Synthese der Primer ist durch die Firmen Eurogentec (Köln) und Invitrogen (Karlsruhe) erfolgt.

Zur Unterscheidung von cw-, *Ac*- und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Konstrukten (2.4, 2.15) werden verwendet:

Unterscheidung von *Ac*- und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Konstrukten:

cwDs1: 5'-CATCCGCGGTCTCCCTGTCTCC-3' (22 nt), T_m = 94°C

cwDs2: 5'-TTTGCCCTCTTCTGTGGTGCTTCT-3' (24 nt), T_m = 72°C

Unterscheidung zwischen cw- und nicht-cw-Konstrukten (5'-*TIR*):

pBR1: 5'-AAGAGCCGCGAGCGATCCTTGAAG-3' (24 nt), T_m = 65°C

Ac12: 5'-TGTGGTGCCTGGTGCAGCCCA-3' (21 nt), T_m = 66°C

Für Ac-Transposase-Schnelltests werden folgende Primer verwendet:

- cwAH2-5*: 5'-TGACTTTGTTAGGGTCATTAGAA-3' (23 nt), $T_m = 48^\circ\text{C}$
cwAH2-6: 5'-GAACGCAGACTCAGAAGCAACAG-3' (23 nt), $T_m = 56^\circ\text{C}$
Hv-waxy1: 5'-AACGCGCCGCTAGCTCACCAGAT-3' (23 nt), $T_m = 74^\circ\text{C}$
Hv-waxy2: 5'-CAGCATACGCCCAGACCACCATTG-3' (24 nt), $T_m = 76^\circ\text{C}$

Für Sequenzierungen werden folgende Standardprimer verwendet:

- T7QL*: 5'-CGACTCACTATAGGGCGAAT-3' (20 nt), $T_m = 60^\circ\text{C}$
T7-Promotor: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (22 nt), $T_m = 64^\circ\text{C}$
M13-Forward: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3' (18 nt), $T_m = 54^\circ\text{C}$
M13-Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (17 nt), $T_m = 50^\circ\text{C}$
M13-R-Mod: 5'-CACACAGGAAACAGCTATGACC-3' (22 nt), $T_m = 50^\circ\text{C}$
cwAH2-3: 5'-TGCCATCTTCCACTCCTCGGCTTTAG-3' (P. 2655-80) $T_m = 64^\circ\text{C}$
cwAH2-4: 5'-GGTGCTTTCTTTTCATGTGAGGTGTGCTT-3' (Pos. 2274-2301) $T_m = 63^\circ\text{C}$
cwAH2-6: 5'-GAACGCAGACTCAGAAGCAACAG-3' (Pos. 3309-31) $T_m = 56^\circ\text{C}$

Zur Herstellung von DIG-markierten Sonden (2.3) werden folgende Primer verwendet:

Sonde *Ac5'*:

- Ac5*: 5'-AGTTGATGTCTACCACAAGAG-3' (21 nt), $T_m = 60^\circ\text{C}$
Ac6: 5'-CTAACC ACTTCATCGTACTTA-3' (21 nt), $T_m = 58^\circ\text{C}$

Sonde *Ac3'*:

- cwAH2-5*: 5'-TGACTTTGTTAGGGTCATTAGAA-3' (23 nt), $T_m = 50^\circ\text{C}$
Int3-R: 5'-AGTCTAGCACCTCGAGATCACC-3' (22 nt), $T_m = 52^\circ\text{C}$

Sonde *GUS1/2*:

- GUS-Ds-1*: 5'-CTTTGCCGTAATGAGTGACC-3' (20 nt), $T_m = 60^\circ\text{C}$
GUS-Ds-2: 5'-AATTGCCCGGCTTTCTTGTA-3' (21 nt), $T_m = 60^\circ\text{C}$

2.15.2 Sonden

Tabelle 5: Verwendete Digoxigenin-markierte Sonden

Sonde*	Länge	Position	Temperatur
<i>Ac5'</i>	738 nt	992 bis 1730 im <i>cwAc₁₀₃₋₈₀₇</i> -Element 358 bp überlappend mit der Deletion in <i>Ac₁₀₃₋₈₀₇</i> 1043-1777 im <i>wt-Ac</i> -Element	42°C
<i>Ac3'</i>	580 nt	2992 bis 3571 im <i>cwAc₁₀₃₋₈₀₇</i> -Element im <i>Ac</i> -Element	42°C
<i>GUS1/2</i>	638 nt	Position 5822 bis 6460 im <i>Act/mDs/GUS</i> -Konstrukt	42°C
<i>Ac-RNA</i>		<i>in vitro</i> -Transkript der <i>Ac</i> -cDNA	70°C

*Alle verwendeten Sonden werden in formamidhaltigen Hybridisierungslösungen verwendet.

Die DNA-Sonden *Ac5'*, *Ac3'* und *GUS1/2* werden durch PCR (2.15) hergestellt, 10 ng Template-DNA ergeben nach 30 Zyklen eine Ausbeute von ca. 1 µg. Als Template wird für *Ac5'* mit *HindIII* restringiertes Plasmid *pAct/mDs/GUS* und für *Ac3'* *PvuII* restringiertes Plasmid *pAH2* verwendet. Es werden Zyklen von 45 Sek. Denaturierung bei 96°C, eine Min. Annealing bei 56°C für *Ac5'* und 50°C für *Ac3'* und je zwei Min. Synthese bei 72°C verwendet.

Tabelle 6: Reaktionsansätze für den *Ac*-Schnelltest nach Optimierung:

Reagenzien	Mengen auf 100 µl <i>Ac5'</i>	Mengen auf 100 µl <i>Ac3'</i>
Reaktionspuffer	10 µl	10 µl
Nukleotidmix (10 mM)	10 µl	4 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3 µl	3 µl
Primer (10 µM)	5 µl	5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U / µl)	1 µl	1 µl
DIG-11-dUTP	3,5 µl	4 µl

Die RNA-Sonde *Ac-RNA* wird durch *in vitro*-Transkription (2.13) gewonnen.

2.16 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die amplifizierten Fragmente aus der RT-PCR werden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (2.20.1) mittels TaKaRa RECOCHIP (TaKaRa Biomedicals, Otsu, Japan) aus dem Gel isoliert, in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] (2.3) subkloniert. Die Ligation der PCR-Fragmente mit dem Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] wird nach Angaben des TOPO[®] TA Cloning Kit (2.1) durchgeführt. Die Anlagerung von Vektor und PCR-Fragment wird durch als ‚sticky ends‘ überhängende Thymine im Vektor und durch die von der *Taq*-DNA-Polymerase an PCR-Produkte angehängten Adenine vermittelt. Die Ligation erfolgt durch Ligasekatalyse. Eine Insertion unterbricht das *lacZ*-Gen im Vektor.

Die Transformation von kompetenten TOP10F[']-*Escherichia coli*-Zellen (2.18) mit pCR[®]2.1-TOPO[®] und die anschließende Blau/Weiß-Selektion erfolgen ebenfalls nach Angaben des Herstellers. Zur Vereinzelnung von Bakterienkolonien wird auf dYT-Festmedium mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die einzelnen Klone werden nach Blau/Weiß-Selektion mittels Kolonie-PCR (2.15) mit den Primern *M13-Forward* und *M13-Reverse* reamplifiziert und erneut gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Zur Amplifizierung der Plasmid-DNA werden einzelne Kolonien der transformierten Bakterien in 5 ml dYT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C und 250 rpm kultiviert. Die Bakterien werden anschließend zur Gewinnung von Plasmid-DNA mit dem Genelute[®] Plasmid Mini-prep Kit (2.19.1) verwendet.

Sequenzierungen werden von der Firma DNA-Cloning-Service (Hamburg) durchgeführt.

2.17 Klonierung des Transformationskonstruktes p*Ubi::mDs::GUS*

Zunächst ist aus p*UbiGUS* (2.4) die *Hind*III-Schnittstelle durch *Hind*III-Restriktion, Klenow-Behandlung und *blunt*-Religation entfernt worden, um später ein *Hind*III-Fragment aus dem *Ac*-Element deletieren zu können, ohne dabei auch den Vektor zu restringieren.

Nach *Sal*I-Restriktion zur Linearisierung des Vektors ist gefällt und erneut eine Klenow-Behandlung durchgeführt worden. Dann ist das 4624 bp umfassende *Bss*HIII-*Pst*I-Fragment, welches das *Ac*-Element enthält, aus dem Plasmid p*JAc* (2.3) isoliert worden. Dazu ist zuerst eine *Bss*HIII-*Pst*I-Doppelrestriktion, nach der Fällung eine Klenowbehandlung durchgeführt und anschließend das Fragment in einem präparativen Gel aufgereinigt (2.20.1) worden.

Das *Bss*HIII-*Pst*I-Fragment ist anschließend in den Vektor hineinligiert worden. Das so entstandene Konstrukt *pUbi::Ac::GUS* ist in *Escherichia coli* vermehrt, aufgereinigt und das *Hind*III-Fragment aus dem translatierten Bereich von *Ac* durch Restriktion und Religation entfernt worden. Für das so gewonnene Konstrukt *pUbi::mDs::GUS* bestätigen Testrestriktionen mit den Enzymen *Bam*HI, *Hind*III, *Cla*I und Sequenzierung der Enden den Erfolg der Klonierung.

Restriktionen werden unter Optimalbedingungen (Sambrook *et al.* 1989) durchgeführt, dazu werden zu 42,9 µl sterilem Wasser 5 µg *pUbiGUS*-Plasmid in 1,6 µl, 5,0 µl 10x-Puffer und 5 U *Hind*III in 0,5 µl für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Fällungen werden mit 1/10 Volumen NaAc (3 M), drei Volumina absoluten Ethanol für 30 Min. bei 4°C durchgeführt. Anschließend wird in 300 µl 70%igen Ethanol gewaschen und in sterilem deionisiertem Wasser resuspendiert.

Für Klenow-Reaktionen werden 2 µg DNA in 17 µl sterilem Wasser mit 2 µl 10x-Klenow-Puffer, 0,5 µl 2 mM dNTPs und 0,5 µl Klenow Fragment (10 U/µl) versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird bei 70°C für zehn Min. inaktiviert.

0,5 – 1 µg DNA bzw. dieselbe Menge vom Ligationsansatz werden in einem Glasröhrchen mit 200 µl kompetenten Zellen gemischt und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Dann wird ein Heat-Shock für 90 sec. bei 42°C durchgeführt und sofort auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wird in 800 µl raumtemperierten SOC-Medium (ohne Antibiotikum) 1h bei 37°C geschüttelt und jeweils 200 µl auf dYT-Platten (mit Antibiotikum, Amp 100 µg/ml) ausplattiert. Inkubiert wird über Nacht bei 37°C.

2.18 Bakterienkultur

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wird der Bakterienstamm TOP10F' (*Escherichia coli*) von Invitrogen (Karlsruhe) nach Angaben des TOPO[®] TA Cloning Kit (2.1) transformiert; Genotyp: F-, *mcrA*, D(*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*), *f80lacZDM15*, *DlacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, D(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (StrR), *endA1*, *nupG*.

Für die Kultur von Bakterien werden dYT (double Yeast Tryptone)-Medien (Sambrook *et al.* 1989) verwendet.

2.18.1 Medien für die Bakterienkultur

dYT-Flüssigmedium	5 g/l NaCl 16 g/l Trypton 10 g/l Hefe-Extrakt Autoklavieren.
dYT-Flüssigmedium + Selektion	dYT-Flüssigmedium 100 mg/l Ampicillin Lagerung bei 4°C im Dunkeln, nicht länger als drei Wochen.
dYT-Festmedium	dYT-Flüssigmedium 15 g/l Agar Autoklavieren.
dYT-Festmedium + Selektion	dYT-Festmedium 100 mg/l Ampicillin Lagerung bei 4°C im Dunkeln, nicht länger als drei Wochen.
SOC-Medium	20 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 20 mM Glukose 10 mM MgCl ₂ 8,6 mM NaCl 2,5 mM KCl pH 7.0 mit NaOH

2.19 Plasmid-Präparation

2.19.1 Plasmidpräparation mittels Genelute® Mini-Prep Kit (Sigma, München)

Es wird die Plasmid-DNA-Isolierung mit dem Genelute® Plasmid Mini-prep Kit (2.1) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Folgende Veränderungen werden dabei vorgenommen:

1. Es werden 2 ml einer über Nacht in dYT-Medium (2.18.1) mit 100 mg/l Ampicillin bei 37°C und 250 rpm inkubierten Kultur rekombinanter TOP10F' *Escherichia coli* (2.3) verwendet.
2. Das Suspendieren im Resuspensionspuffer erfolgt durch Pipettieren und Vortexen.
3. Es wird nach maximal fünf Min. mit Neutralisierungspuffer (Genelute® Plasmid Mini-prep Kit) bei Raumtemperatur präzipitiert.
4. Der Überstand wird auf die Miniprep-Säule gegeben und durch Zentrifugation für eine Min. bei 6500 rpm und für eine weitere Min. bei 13000 rpm an die Säule gebunden.
5. Nach Entfernen der Waschlösung (Genelute® Plasmid Mini-prep Kit) aus dem Reaktionsgefäß wird zweimal für zwei bzw. eine Min. trocken zentrifugiert.
6. Die Elution der DNA erfolgt in 50 µl sterilem deionisierten Wasser nach fünf Min. Inkubation durch Zentrifugation für eine Min. bei 6500 rpm und für eine weitere Min. bei 13000 rpm.

Alle Zentrifugationsschritte werden in einer Heraeus Biofuge (2.6) durchgeführt.

2.19.2 Plasmidpräparation nach der 1-2-3-Methode

(Sambrook *et al.* 1989, nach Birnboim und Doly 1979 sowie Ish-Horowicz und Burke 1981)

Anderthalb ml einer 5-ml-Übernachtskultur werden in ein Reaktionsgefäß gefüllt und für 30 Sek. bei 13500 rpm und 4°C in einer Heraeus Biofuge zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Bakterienpellet wird in 500 µl STE-Puffer gewaschen, für 30 Sek. bei 13500 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 wird durch Invertieren vorsichtig gemischt und auf Eis gestellt. Dann werden 150 µl Lösung 3 zugegeben und das Reaktionsgefäß wird für zehn Sek. gevortext. Es wird für maximal fünf Min. auf Eis inkubiert und bei Bedarf eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Danach wird für fünf Min. bei 13500 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit zwei Volumina absolutem Ethanol versetzt, gevortext und für zwei Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Es wird anschließend fünf Min. bei 13500 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, mit 1 ml kalten siebzigprozentigen Ethanol gewaschen, das Pellet nach Abnehmen des Ethanol im kopfüber platzierten Reaktionsgefäß für zehn Min. getrocknet und anschließend in 20 bis 50 ml TE-Puffer (2.8.1) gelöst.

Lösung 1	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl (pH 8.0) 10 mM EDTA (pH 8.0) Autoklavieren, Lagerung bei 4°C Vor Gebrauch 100 µg/ml RNaseA zugeben
Lösung 2	0,2 N Natriumhydroxid 1% SDS Vor Gebrauch frisch ansetzen.
Lösung 3	3 M Kaliumacetat 11,5% Eisessig Lagerung bei 4°C
STE-Puffer	0,1 M NaCl 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA (pH 8.0)

2.20 Gelelektrophorese

2.20.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Für die erwartete Fragmentgröße geeignete Agarose-Konzentrationen werden nach Sambrook *et al.* (1989) bestimmt. Es werden 0,8 bis 1,2% Agarose in 1x TAE (2.20.1.1) verwendet. Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid erfolgt entweder nach Abkühlen auf unter 60°C oder durch 15 Min. Inkubation des fertigen Gels in einem Ethidiumbromid-Färbebad mit 10 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE. Als Laufpuffer wird 1x TAE verwendet und je nach Größe und Dicke des Gels werden Spannungen von 60 bis 90 V angelegt. Alle Proben werden mit 10% Blaumarker versetzt und aufgetragen. Die ethidiumbromidhaltigen Gele werden unter UV-Licht fotografiert.

TAE-Puffer	40 mM Trisacetat (pH 8.0) 10 mM EDTA (pH 8.0)
Blaumarker	50% Glycerin 75 mM EDTA (pH 8.0) 0,3% Bromphenolblau

2.20.2 Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Zur Einschätzung der Qualität von RNA-Präparaten werden diese in Formaldehyd-Agarose-Gelen aufgetrennt. Gelkammer, Träger und Kämme werden mit 3 M NaOH gewaschen und mit DEPC-behandeltem, RNase-freien Wasser gespült, um sie von RNase zu befreien. 0,6 g (1,5 %) Agarose und 29 ml DEPC-Wasser werden in eine 200 ml-Schottflasche gegeben, gewogen und kurz aufgekocht. DEPC-Wasser wird auf der Waage nachgefüllt, um Verdunstungsverluste auszugleichen. Das Gel wird auf circa 65°C im Wasserbad abgekühlt, 4 ml 10x MOPS-Puffer und 7,1 ml Formaldehyd werden zugegeben und das Gel wird in den Gelträger gegossen. Es werden pro Probe 2 µl 10x MOPS-Puffer, 3,5 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid aliquotiert, 4,5 µl der RNA-Probe hinzugeben und es wird zehn Min. lang bei 65°C inkubiert. Anschließend wird sofort auf Eis abgekühlt. Es werden jeweils 1 µl Blaumarker (2.20.1) und 1 µl Ethidiumbromid zu den Proben gegeben, diese kurz anzentrifugiert und auf das Gel auftragen. Die Auftrennung erfolgt bei 60 V.

MOPS-Puffer (pH 7.0)	20 mM MOPS (3-(N-morpholino)propansulfonsäure) 5 mM Natriumacetat (pH 5.2) 10 mM EDTA pH-Einstellung mit NaOH (s)
RNA-Denaturierungspuffer	1 x MOPS 6,5% Formaldehyd 50% Formamid 50 mg/ml Ethidiumbromid Lagerung bei -20°C
RNA-Ladepuffer	50% Glycerin 1 µM EDTA 0,25% Bromphenolblau Lagerung bei -20°C

2.21 Transfer von DNA auf eine Membran (Southernblotting)

(Southern 1975)

Hinweise auf die Anwesenheit bestimmter Fragmente in der genomischen DNA geben Enzymrestriktionen, die gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Membranen übertragen werden, die anschließend mit entsprechenden Sonden hybridisiert werden (Southern 1975). Verwendet wurden zur Detektion zwei DIG-markierte Sonden, von denen eine nahe am 5'-Ende im zweiten Exon (735 bp, Position 1043-1777), um 358 bp überlappend mit der Deletion in *Ac₁₀₃₋₈₀₇*, und die andere näher am 3'-Ende (580 bp, Position 2992-3571) bindet.

Die restringierte genomische DNA wird gelelektrophoretisch in 0,8% Agarose (2.2.6) aufgetrennt. Um den Transfer von Fragmenten von über 3 kb zu verbessern, werden Bruchstellen in die DNA eingeführt. Dazu wird das Gel zehn Min. in 0,2 M HCl geschüttelt und anschließend mit deionisiertem Wasser gespült. Danach wird es 30 Min. in Denaturationspuffer (2.21.1) geschüttelt und erneut mit deionisiertem Wasser gespült. Zur

Neutralisierung wird das Gel zweimal 20 Min. in Neutralisationspuffer (2.21.1) geschüttelt. Das so vorbehandelte Gel wird luftblasenfrei auf zwei Lagen Whatmanpapier gelegt, die in 20x SSC (2.21.1) vorgetränkt sind und an beiden Enden in ein Reservoir mit 20x SSC eintauchen. Eine passend geschnittene Membran (Hybond[®]NX, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wird luftblasenfrei aufgelegt, eine 1 cm dicke Schicht Filterpapier (Whatman 3MM, Groß Britannien) und 5 cm Saugpapier werden darauf aufgeschichtet und mit einem Gewicht von etwa 500 g beschwert. Die Seiten werden abgedichtet, so dass die Flüssigkeit nur durch die Membran und das Whatmanpapier ins Saugpapier gelangen kann. Der Transfer erfolgt für mindestens acht Stunden oder über Nacht.

Nach dem Transfer der DNA vom Gel auf die Membran wird die Membran in 2x SSC kurz gespült und für zweimal 15 Min. auf Whatman-Filterpapier (2.1) getrocknet. Dann wird durch beidseitige Bestrahlung der Membran mit UV-Licht mit jeweils 1200 $\mu\text{J}/100 \text{ cm}^2$ (2.6) die DNA fixiert. Anschließend werden die Blots direkt hybridisiert oder, in Folie eingeschweißt, bei 4°C gelagert.

2.21.1 Lösungen für Southernblotting- und Northernblotting-Analysen und nicht-radioaktiven Nachweis der Hybridisierungssignale

Denaturierungspuffer	1,5 M Natriumchlorid 0,5 M Natriumhydroxid
Neutralisierungspuffer	1,0 M Tris/HCl (pH 7.4) 1,5 M Natriumchlorid
SSC 20x	3,0 M Natriumchlorid 0,3 M Natriumcitrat
Vorhybridisierungslösung	1,5% Blocking Reagenz (w/v) 2,5x SSC 0,05% Na-Lauryl-Sarcosin (v/v) 0,1% SDS (w/v) 50% Formamid 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denaturierte Heringssperma-DNA Lagerung: -20°C. Bei Wiederverwendung 10 Min. auf 65°C erhitzen.

Hybridisierungslösung	wie Vorhybridisierungslösung Sonde 25 ng/ml für zehn Min. im kochenden Wasserbad denaturiert. Lagerung bei -20°C. Bei Wiederverwendung für zehn Min. auf 65°C erhitzen.
W1-Lösung	2x SSC 0,1% SDS (w/v)
W2-Lösung	0,5x SSC 0,1% SDS (w/v)
W3-Lösung	0,2x SSC 0,1% SDS (w/v)
W4-Lösung	0,1x SSC 0,1% SDS (w/v)
B1-Lösung (pH 7.5)	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH-Einstellung mit NaOH (s)
WB-Lösung	B1-Lösung 0,3% Tween [®] 20
B2-Lösung	B1-Lösung 1,5% Blocking Reagenz (w/v) Lagerung bei -20°C.
B2 + Antikörper	B2-Lösung + Anti-Digoxigenin AB Fab-Fragmente (1:7500). Lagerung bei 4°C.

B3-Lösung	100 mM Tris (pH 9.5) 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ Vor Gebrauch frisch ansetzen.
CSPD-Substratlösung	B3-Lösung 0,1 mg/ml CSPD
Alkalische Waschlösung	0,2 M NaOH 0,1% SDS (w/v)

2.22 Transfer von RNA auf eine Membran (Northernblotting)

(Goto *et al.* 2003)

Präparationen von gesamt-RNA oder mRNA werden gelelektrophoretisch in einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel (2.2.6) aufgetrennt. Das Gel wird für 10 Min. in bidestilliertem DEPC-behandeltem Wasser und 10 Min. in 20x SSC-Lösung gespült.

Das so vorbehandelte Gel wird luftblasenfrei auf zwei Lagen Whatmanpapier gelegt, die in 20x SSC (2.21.1) vorgetränkt sind und an beiden Enden in ein Reservoir mit 20x SSC eintauchen. Eine passend geschnittene Membran (Hybond[®]NX, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wird luftblasenfrei aufgelegt, eine 1 cm dicke Schicht Whatmanpapier (2.1) und 5 cm Saugpapier werden darauf aufgeschichtet und mit einem Gewicht von etwa 500 g beschwert. Die Seiten werden abgedichtet, so dass die Flüssigkeit nur durch die Membran und das Whatmanpapier ins Saugpapier gelangen kann. Der Transfer erfolgt für mindestens 8 Stunden oder über Nacht.

Nach dem Transfer der gesamt-RNA oder mRNA vom Gel auf die Membran wird die Membran in 2x SSC kurz gespült und für zweimal 15 Min. auf Whatman-Filterpapier (2.1) getrocknet. Dann wird durch beidseitige Bestrahlung der Membran mit UV-Licht (Stratalinker UV Crosslinker, Stratagene, Heidelberg) mit jeweils 1200 µJ/100 cm² die DNA fixiert. Anschließend werden die Blots direkt hybridisiert oder, in Folie eingeschweißt, bei 4°C gelagert.

Zur Kontrolle werden ‚Dotblots‘ hergestellt. Dazu werden jeweils 1 ng; 100 pg; 50 pg; 10 pg; 7,5 pg; 5 pg, 2,5 pg; 1 pg; 750 fg; 500 fg; 250 fg und 100 fg in einem µl deionisiertem DEPC-

Wasser auf eine Hybond®NX-Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen.

2.23 Hybridisierung und chemiluminographischer Nachweis der Hybridisierungssignale

Die Vorhybridisierungslösung (2.21.1) wird bei der ersten Verwendung mit 50% Formamid versetzt. Heringssperma-DNA wird für zehn Min. aufgekocht, anschließend sofort auf Eis gekühlt und in einer Konzentration von 50 µg/ml zur Vorhybridisierungs- und Hybridisierungslösung zugegeben.

Hybridisierungslösungen DNA

50% Formamid
 1,5% Blocking Reagenz
 2,5x SSC
 0,05% N-Lauroyl-Sarcosin
 0,1% SDS
 50 µg/ml Heringssperma-DNA
 25 ng/ml Sonde

Hybridisierungslösungen RNA

50% Formamid
 1% Blocking Reagenz
 2,5x SSC
 0,05% N-Lauroyl-Sarcosin
 0,1% SDS
 200 µg/ml Heringssperma-DNA
 100 ng/ml Sonde

Es wird Blocking Reagenz von Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet.

Bei erneuter Verwendung der Vorhybridisierungslösung wird vor Gebrauch bei 65°C für zehn Min. erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Die Blotmembran wird mit 5x SSC angefeuchtet und luftblasenfrei in die Hybridisierungsflasche überführt. Pro 100 cm² Membranfläche werden 20 ml Vorhybridisierungslösung verwendet. Es wird bei 42°C im Hybridisierungsofen (GFL, Burgwedel) für mindestens zwei Stunden vorhybridisiert.

Die Hybridisierungslösung wird wie die Vorhybridisierungslösung angesetzt, enthält jedoch zusätzlich 2-3 ng/ml der benötigten Sonde (2.15.2). Beim Ansetzen frischer Lösung wird die Sonde zusammen mit der Heringssperma-DNA für zehn Min. aufgekocht, sofort auf Eis abgekühlt und zugegeben. Bei Wiederverwendung wird für zehn Min. auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Vorhybridisierungslösung wird aus den Hybridisierungsflaschen entfernt und es werden 10 ml Hybridisierungslösung pro 100 cm² Membran zugegeben. Die Hybridisierung erfolgt bei 42°C für mindestens sechs Stunden oder

über Nacht. Die Hybridisierung von Northernblots erfolgt nach Optimierung bei 70°C mit 100 ng/ml Sonde.

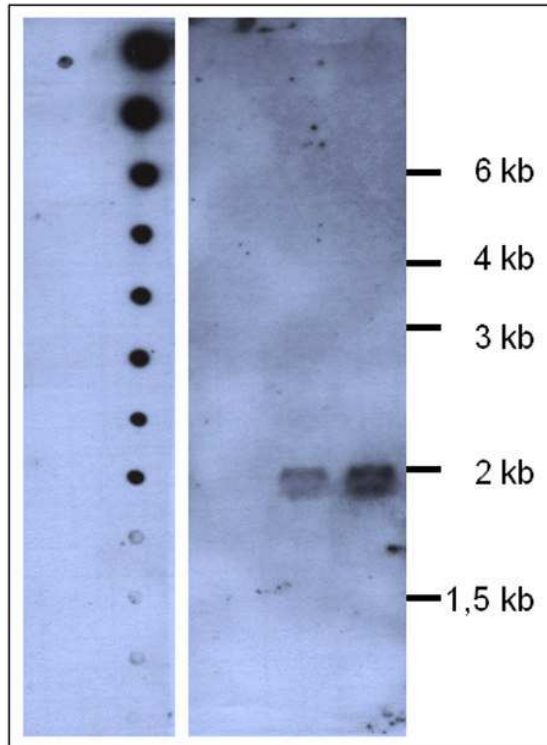


Abbildung 2: Optimierung von Northernblotting-Analysen

Optimierung der DIG-Northernblotting-Methode: Gelelektrophoretische Auftrennung von jeweils 2 µg mRNA der Linie ‚Golden Promise‘ (GP) mit 0,5 bzw. 1,0 ng eines *in vitro*-Transkripts von *Ac*. Sensitivitätstest der Methode anhand eines Dot-Blots mit *in vitro*-Transkripten von *Ac* (2.13) in *sense*(s)- und *antisense*(α)-Orientierung.

Die Hybridisierungslösung wird aus der Hybridisierungsflasche entfernt, die Membranen werden entnommen und zweimal für zehn Min. mit jeweils 250 ml W1-Lösung (2.21.1) bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird jeweils 15 Min. mit 250 ml W2-Lösung (2.21.1) bei 65°C für Southernblotting-Analysen und bei 68°C für Northernblottinganalysen, dann mit 250 ml W3-Lösung (2.21.1) bei 65°C bzw. mit W4-Lösung bei 68°C geschüttelt.

Die hybridisierten und gewaschenen Membranen werden fünf Min. bei Raumtemperatur in 200 ml WB-Lösung (2.21.1) inkubiert und mindestens 30 Min. bei Raumtemperatur in 150 ml B2-Lösung (2.21.1) geschüttelt. Dann wird für 30-120 Min. in B2-Lösung mit 1:7500 Anti-DIG-Antikörperkonjugat (Anti-Digoxigenin AB Fab-Fragmente, Roche Diagnostics Mannheim) inkubiert. Die Membran wird in ein neues Gefäß überführt und dreimal für 15 Min. in 200 ml WB-Lösung gewaschen. Es wird fünf Min. in 150 ml frischer B3-Lösung äquilibriert, dann wird die Membran mit 5 ml CSPD-Substratlösung (Dinatrium 3-(4-methoxy Spiro {1,2-dioxethan-3,2'-(5'-Chloro) Tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] Decan}-4-yl) Phenylphosphat, Roche Diagnostics, Mannheim) überschichtet und fünf Min. inkubiert. Die Membran wird zwischen zwei Blatt Filterpapier getrocknet (2.1), in Frischhaltefolie

eingefaltet und für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wird zur Detektion ein Röntgenfilm (Hyperfilm™, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) exponiert und entwickelt. Die Expositionszeiten variieren zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden.

Wird die Membran zusätzlich mit einer zweiten Sonde hybridisiert, wird die alte Sonde zuvor wie folgt abgewaschen:

Die Membran wird zweimal für je eine Min. in deionisiertem Wasser geschüttelt. Anschließend wird sie zweimal jeweils zehn Min. bei 37°C in alkalischer Waschlösung (2.21.1) geschüttelt und zweimal in 2x SSC (2.21.1) gespült. Danach kann sie vorhybridisiert und erneut hybridisiert werden.

2.24 Isolierung und Kultivierung von Gerstenmikrosporen

Basierend auf einem nach Olsen (1987), Kasha *et al.* (1990), Wan und Lemaux (1994) und Pasternak *et al.* (2002) modifizierten Protokoll werden Gerstenähren zur Isolierung von Mikrosporen vor ihrer Reife (Gaul *et al.* 1976) circa 5 Monate nach der Keimung der Pflanze geerntet. Beim Gerstenkultivar *Igri* erfolgt dies spätestens, wenn die Spitzen der Grannen 2-3 mm aus dem Fahnenblatt hervorschauen, während beim Kultivar ‚*Golden Promise*‘ die Ernte der Ähren bereits erfolgen muss, wenn die Ährenspitze noch circa 12 bis 13 cm von der Achsel des Fahnenblattes entfernt ist, jedoch die Ähre bereits mindestens 7 cm lang ist. Die Hüllblätter werden entweder durch Besprühen mit 70%igem Ethanol oder durch kurzes Eintauchen in ein mit 70%igem Ethanol gefülltes Gefäß sterilisiert. Die Ähren werden unter sterilen Bedingungen aus der Hülle entfernt und mit einer Pinzette von den Grannen befreit. Die oberen und die unteren Antheren werden ebenfalls entfernt.

Die Kältevorbehandlung der Gerstenähren stoppt die Pollenentwicklung und erfolgt für bis zu fünf Ähren gemeinsam in einer mit Parafilm versiegelten Petrischale auf mit sterilem Leitungswasser befeuchtetem Filterpapier (3MM Whatman-Biometra, Göttingen) für drei bis viereinhalb Wochen bei 4°C.

Die Isolierung von Mikrosporen im mittleren bis späten Einkernstadium erfolgt auf Eis und möglichst zügig um eine hohe Vitalität der Mikrosporen zu gewährleisten. Jeweils 15 der vorbehandelten Gerstenähren werden in circa 1 cm lange Abschnitte geschnitten und mit 20 ml 0,4 M Mannitol in einem Blender auf niedrigster Stufe zweimal für je fünf Sek.

zerkleinert. Die Mikrosporensuspension wird durch ein Nylonsieb mit einem Porendurchmesser von 100 µm in eine Magentadose gegeben. Die Ährenreste werden mit einer Pinzette leicht ausgedrückt und der Vorgang wird mit jeweils 10 ml 0,4 M Mannitol zweimal wiederholt. Gewebereste werden durch Spülen mit 5 ml 0,4 M Mannitol aus dem Blender entfernt. Die Mikrosporensuspension wird mit einer 10-ml-Weithalspipette in ein steriles 50-ml-Falconröhrchen überführt und die Magentadose ebenfalls mit 5 ml 0,4 M Mannitol ausgespült. Die Mikrosporen werden für zehn Min. bei 100x g und 4 °C zentrifugiert. Der grünliche Überstand wird mit einer 10-ml-Enghalspipette abgenommen und verworfen und das Mikrosporenpellet in 8 ml 0,55 M Maltose I resuspendiert. Die Mikrosporensuspension wird mit einer Weithalspipette in ein Glasröhrchen überführt und durch Aufsetzen der Pipette in der Mitte des Flüssigkeitsspiegels vorsichtig mit 1,3 ml 0,4 M Mannitol überschichtet. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 40 % in der Hettich-Zentrifuge können die in der Interphase flotierenden Mikrosporen vorsichtig unter Drehen des Röhrchens möglichst vollständig mit einer 1-ml-Einwegpipette abgenommen werden. Die Mikrosporensuspension wird in einem weiteren 50-ml-Falconröhrchen mit 0,4 M Mannitol auf 10 ml aufgefüllt, gründlich durchmischt und je ein Tropfen für die Auswertung in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bzw. für die Bestimmung der Mikrosporenvitalität verwendet. Es werden nur die intakten Mikrosporen in je fünf Großquadraten des oberen und unteren Messfelds der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Hämacytometer 0,0625 mm² und 0,2 mm Schichtdicke von PlanOptik, Elsoff) ausgezählt. Die Summe aus zehn Großquadraten mal 500 ergibt die Mikrosporenanzahl pro ml Suspension.

Die Vitalität der Gerstenmikrosporen wird durch Verdünnung von 0,5 ml einer gut durchmischten Mikrosporen-Suspension in 0,4 M Mannitol in einer Petrischale mit weiteren 0,5 ml 0,4 M Mannitol und Zugabe von 5 µl Fluoreszeindiazetat (FDA)-Stocklösung (Widholm 1972) bestimmt. Unter dem UV-Mikroskop (UV-Licht und etwas Normlicht) werden die fluoreszierenden vitalen und nicht-fluoreszierenden abgestorbenen Mikrosporen in je zehn Feldern ausgezählt und die Vitalitätsrate mit Hilfe des Analyseprogramms (2.5) bestimmt.

Die Suspension wird für zehn Min. bei 100 g und 4°C abzentrifugiert.

Bei Mikrosporenkulturen des Gerstenkultivars *Igri* wird mit Hungermedium K99 At 4B eine Populationsdichte von 150 vitalen Mikrosporen pro µl und beim Kultivar GP von 350 bis 400 pro µl eingestellt. Mit einer Weithalspipette wird je 1 ml der Mikrosporensuspension in

Petrischalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm verteilt und mit Parafilm versiegelt. Die weitere Kultivierung erfolgt wie in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Kulturbedingungen für Gerstenmikrosporen

Medium	Temperatur	Zeit	Beleuchtung	Umsetzung
K99 At 4B	26°C oder 20°C	2 oder 3 d	Dunkel	1 ml pro Schale (Ø 3,5 cm)
K99 4B C	26°C	2 Wochen	Dunkel	1 ml pro Schale (Ø 3,5 cm)
K99 D 4P C	26°C	3 Wochen	Dunkel	Filter auf Festmed. (Ø 4,7 cm)
K99 D 4P C	26°C	2 Wochen	Dunkel	Filter auf frisches Festmedium
K4N	26°C	1 Woche	Dunkel	Filter auf Festmed. (Ø 10 cm)
K4N	26°C	2 Wochen	Licht	Filter auf Festmed. (Ø 10 cm)
K4N	26°C	3 Wochen	Licht	frisches Festmedium (Ø 10 cm)

2.24.1 Lösungen für die Isolierung von Gerstenmikrosporen

Isolierungslösung	0,4 M Mannitol sterilfiltriert, vorgekühlt auf 4 °C
Dichtegradientenzentrifugationslg.	0,55 M Maltose I sterilfiltriert, vorgekühlt auf 4 °C
FDA-Stocklösung	0,5 mg/ml Fluoreszeindiazetat in Aceton Lagerung bei 4°C im Dunkeln.

2.24.2 Medien für die Gewebekultur von Gerstenmikrosporen

K4N-Makrosalze (20x)	80 mM NH ₄ NO ₃ 720 mM KNO ₃ 50 mM KH ₂ PO ₄ 60 mM CaCl ₂ 20 mM MgSO ₄ Autoklavieren. Lagerung bei RT.
----------------------	--

K4N-Mikrosalze (1000x)	50 μ M MnSO_4 50 μ M H_3BO_3 25 μ M ZnSO_4 0,5 μ M Na_2MoO_4 0,1 μ M CuSO_4 0,1 μ M CoCl_2 1 μ M KI Sterilfiltrieren. Lagerung bei 4°C
Hungermedium (K99 At 4B)	0,4 M Maltose I 2 mM MES ([2-N-morpholino]ethansulfonsäure) pH 5,5 100 mg/l Claforan 1 mM CaCl_2 Lagerung bei 4 °C
Kulturmedium (K99 4B C)	1x K4N-Makrosalze 1x K4N-Mikrosalze 75 μ M Na-Fe-EDTA 0,25 M Maltose I 4 μ M BAP (6-Benzylaminopurin) 7 mM Glutamin 0,5 mM NaOH 100 mg/l Claforan Lagerung bei 4°C
Differenzierungsmedium (fest) (K99 D 4P C)	4 g/l Phytigel 1x K4N-Makrosalze 1x K4N-Mikrosalze 75 μ M Na-Fe-EDTA 0,25 M Maltose I 1 μ M BAP (6-Benzylaminopurin) 100 mg/l Claforan Lagerung bei 4°C

Regenerationsmedium (fest)	4 g/l Phytigel
(K 4N BC)	0,1 M Maltose I
	1x K4N-Makrosalze
	1x K4N-Mikrosalze
	5 μ M CuSO ₄
	75 μ M Na-Fe-EDTA
	1 μ M BAP (6-Benzylaminopurin)
	26 mM Thiamin-HCl (M = 373,73 g/mol)
	8 mM Nicotinsäure (M = 123,11 g/mol)
	5 mM Pyridoxalsäure-HCl (M = 202,63 g/mol)
	1 mM Glutamin
	0,5 mM NaOH
	100 mg/l Claforan
	Lagerung bei 4°C

2.25 Isolierung und Kultivierung von Gerstenskutelli

Für die hier vorgelegte Untersuchung sind 2300 Skutellumproben von jeweils mehreren Pflanzen pro Linie analysiert worden.

Die Isolierung von Skutelli aus Pflanzen der *cwAc* und *cwAc₁₀₃₋₈₀₇*-Linien erfolgt wie bei Scholz (2000) beschrieben. Nach Entspelzen der Körner wird die Oberfläche zunächst für 1 Min. mit 70%igem Ethanol und anschließend mit 1% (v/v) Natriumhypochlorid und 0,2% (v/v) Mucosol für zehn Min. sterilisiert. Längere Sterilisationszeiten schädigen das Skutellumgewebe.

Anschließend erfolgt unter sterilen Bedingungen die Isolierung des Skutellums und die Entfernung des Embryos mit einer Pinzette. Kultiviert wird auf PL-Festmedium (2.25.1) mit 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) bei 26°C für 18 bis 36 Stunden im Dunkeln. 3 bis vier Stunden vor der Transformation wird das Skutellumgewebe auf osmotisches PL-Medium mit 0,7 Mol/l Saccharose (2.25.1) umgesetzt und bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Das Umsetzen nach der Transformation zurück auf nicht-osmotisches PL-Medium scheint sich nicht auf die Anzahl auftretender Signale auszuwirken, wenn die histochemische β -Glucuronidase-Detektion spätestens zwei Tage nach der Transformation durchgeführt wird.

2.25.1 Medien für die Gewebekultur von Gerstenskutelli

(Scholz *et al.* 2001)

Natriumhypochloridlösung	1% NaOCl 0,2% Mucosol
2x PL-Medium (pH 5.7) (Wan und Lemaux 1994)	20% Makrosalze (Murashige und Skoog 1962) 0,2% Mikrosalze für PL-Medium 4 ml Na-Fe-EDTA 5 µM Thiamin-HCl (M = 373,73 g/mol) 3 mM Myo-Inositol (M = 180,16 g/mol) 2 g/l Casein Hydrolysat 0,2 M Maltose (M = 342,30 g/mol) Auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren.
Makrosalze für PL-Medium	wie Makrosalze für MS-Medium (2.24.2)
Mikrosalze für PL-Medium (1000x)	100 mM MnSO ₄ 100 mM H ₃ BO ₃ 40 mM ZnSO ₄ 1 mM Na ₂ MoO ₄ 5 mM CuSO ₄ 0,1 mM CoCl ₂ 5 mM KI Sterilfiltrieren. Lagerung bei 4°C.
PL-Festmedium	1x PL-Medium (Stock: 2x PL) 3 g/l Gelrite (Stock: 6 g/l, autoklaviert) 840 mg/l Prolin 750 mg/l Glutamin 100 mg/l Asparagin 2,5 mg/l 2,4-D

Osmotisches PL-Medium (pH 5.7)	1x PL-Medium
	0,7 M Saccharose
	Sterilfiltrieren.
	3 g/l Gelrite (Stock: 6 g/l, autoklaviert)
	2,5 mg/ml 2,4-D

2.26 Herstellung des Fällungsansatzes und biologische Transformation von Gerstenskutelli

(nach Becker *et al.* 1994; optimiert von Scholz 2000)

Für die Transformation von Pflanzenzellen werden 40 mg Goldpartikel mit Durchmessern von 0,4 bis 1,2 μm von Biorad (München) (2.1) in 1 ml kaltem 96%igen Ethanol aufgenommen und zwei Min. gevortext. Anschließend wird insgesamt dreimal in 96%igem Ethanol gewaschen, indem jeweils zehn Sek. bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen wird. Die Goldpartikel werden zweimal mit Wasser gewaschen; hierfür wird in 1 ml sterilem deionisiertem Wasser aufgenommen, resuspendiert, eine Min. gevortext und bei 10000 rpm zentrifugiert. Sie werden dann erneut in 1 ml sterilem deionisiertem Wasser aufgenommen und es werden jeweils 25 μl davon aliquotiert, wobei vor Entnahme jeden Aliquots gevortext wird. Die Aliquots werden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Als interne Kontrolle wird mit den Genen *c1* und *r1* (2.4) des Anthocyanstoffwechsels aus Mais ko-transformiert. Die Bildung von Anthocyanfarbstoffen im transformierten Gewebe gibt vor der β -Glucuronidase-Färbung Aufschluss über die Transformationseffizienz und über die Vitalität des transformierten Gewebes. Die Menge der internen Standards *c1*-sense und *r1*-sense (2.4) ist von jeweils 13 ng in Vorversuchen auf 7 ng reduziert worden, was eine Verringerung der Signalanzahl von ca. 200 pro transformiertem Skutellum auf im Mittel ca. 60 zur Folge hat und die numerische Auswertung wesentlich beschleunigt.

Die verwendeten Gold- und Plasmidmengen sind gegenüber den von Scholz verwendeten (Dissertation 2000) wie folgt modifiziert worden:

Es wird pro Fällungsansatz ein 25 μl -Goldpartikelaliquot (88 ng Gold) eine Min. gevortext, auf Eis mit 735 ng Transformationsvektoren *pAct/mDs/GUS* oder *pUbi::mDs::GUS* (2.3, 2.17) und jeweils 7 ng der Plasmide *c1*-sense und *r1*-sense (2.3) als interner Standard versetzt

und gut gevortext. 25 µl Calciumchlorid (2,5 M, -20°C) und 10 µl Spermidin (0,1 M, -70°C) werden in den Deckel des Reaktionsgefäßes pipettiert, dieses wird kopfüber geschlossen und sofort für eine Min. gevortext. Danach wird für 15 Sek. bei 13000 rpm anzentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Die Partikel werden in 250 µl kaltem 96%igen Ethanol aufgenommen und resuspendiert, bei 13000 rpm anzentrifugiert und der Überstand wird abgenommen. Die Partikel werden in 40 µl Ethanol durch Vortexen resuspendiert.

Alle Zentrifugationen werden in einer Heraeus Biofuge (2.6) durchgeführt.

Für jede Transformation werden 3,5 µl des gründlich gevortexten Fällungsansatzes unter sterilen Bedingungen auf den Macrocarrier pipettiert. Nach dem Trocknen wird der Transformationsansatz mit der Partikelkanone PDS 1000/He von Biorad (München) und Helium des Reinheitsgrads 5,0 (Messer-Griesheim, Hamburg) mit einem Druck von 1350 psi auf die Gerstenskutelli bzw. Gerstenkalli gebracht. Das transformierte Gewebe wird über Nacht auf dem osmotischen PL-Medium (2.25.1) belassen und bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird auf nicht-osmotisches PL-Festmedium umgesetzt (2.25.1).

Die Signale des internen Standards *c1* und *r1* auf den Kalli werden spätestens zwei Tage nach Transformation unter sterilen Bedingungen bei zehn- bis siebzigfacher Vergrößerung ausgezählt.

Da die Menge der internen Kontrollen *c1*-sense und *r1*-sense (2.3) von jeweils 13 ng (Scholz, Dissertation 2000) auf 7 ng reduziert worden ist, hat sich die Signalanzahl von circa 200 pro transformiertem Skutellum auf im Mittel circa 60 verringert, was zur Folge hat, dass die optische Auswertung wesentlich beschleunigt werden kann.

2.27 Histochemischer β -Glucuronidase-Aktivitätstest

Zwei Tage nach der Transformation werden die Anthocyan-Signale des internen Standards unter dem Binokkular ausgezählt. Anschließend wird der X-Gluc-Färbepuffer mit 1 mg/ml X-Gluc in DMSO versetzt, die Skutelli werden in Reaktionsgefäße überführt und mit X-Gluc-Lösung (2.27.1) überschichtet. Einzelne Gewebeproben werden in Mikrotiterplatten angefärbt. Es wird für mindestens 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Sobald die Positivkontrollen eine kräftige Färbung zeigen, wird die X-Gluc-Lösung entfernt und die Skutelli bzw. Kalli werden mit Konservierungslösung (2.27.1) gespült. Sie werden dann mit Konservierungslösung überschichtet und bei 4°C gelagert bzw. unter dem Binokkular ausgezählt.

2.27.1 Lösungen für den histochemischen β -Glucuronidase-Aktivitätstest

(Jefferson *et al.* 1987)

X-Gluc-Färbepuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 7.0) 1 mM EDTA 0,5 mM Kaliumhexacyanoferrat(II) 0,5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) 0,1% Triton X-100 Lagerung lichtgeschützt bei -20°C.
X-Gluc-Lösung	50 mg/ml X-Gluc in DMSO (Dimethylsulfoxid) Sterilfiltrieren und bei -20°C lagern.
Konservierungslösung / Lagerungspuffer	30% Glycerin 10 mM EDTA 50 mM Tris/HCl (pH 7.0)

2.28 Berechnung der Ac-Transposase-Menge

(1) mRNA = $1-2 \times 10^{-2}$ der gRNA einer Zelle (Sambrook *et al.* 1989)

(2) Ac-Transposase-mRNA = 7×10^{-5} der mRNA einer Zelle (Kunze *et al.* 1987, Schein *et al.* 1990, Fußwinkel *et al.* 1991)

(3) Ac-Transposase-mRNA = 1×10^{-6} der gRNA einer Zelle (1, 2)

Als selten vorkommende RNA-Spezies bezeichnet man solche, die bis 0,5% der mRNA einer Zelle ausmachen (Sambrook *et al.* 1989).

(4) **1 μ g gRNA \rightarrow 10 ng mRNA \rightarrow 1 pg Ac-Transposase-mRNA** (2, 3)

(5) $0,16 \times 10^{-12}$ g (= pg) mRNA pro Zelle (Willing und Mascarenhas 1984)

(6) $0,01 \times 10^{-15}$ (= fg) Ac-Transposase-mRNA pro Zelle (3, 5)

(7) 1 *Ac*-Transposase-mRNA von 3,5 kb wiegt 1192 kDa = 2×10^{-18} g = $0,002 \times 10^{-15}$ g (fg)

(8) 1-12 *Ac*-Transposase-mRNAs pro Zelle (Kunze *et al.* 1987, Fußwinkel *et al.* 1991, Schein *et al.* 1990) (2, 7)

(9) Homozygote synthetisieren die doppelte Transkriptmenge (Kunze *et al.* 1987)

(10) 1 Transkript kann ca. 100x translatiert werden (Fußwinkel *et al.* 1991)

(11) 1 *Ac*-Transposase-Proteinmolekül / 3×10^7 Kernproteine = 1000 *Ac*-Transposase-Proteinmoleküle pro triploider Endospermzelle.

(12) $M(\text{Ac-Transposase-Protein})_{\text{apparent}} = 112 \text{ kDa}$ (Fußwinkel *et al.* 1991)
 $M(\text{Ac-Transposase-Protein})_{\text{theoretisch}} = 92 \text{ kDa}$ (Kunze *et al.* 1987)

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit werden Integrationen des *Ac*-Elements aus Mais (*Zea mays* L.) in Gerste (*Hordeum vulgare* L.), die Prozessierung der *Ac*-Transkripte und die *Ac*-Transposase-Aktivität in Gerste molekularbiologisch charakterisiert. Diese Charakterisierung ist wichtig für das Verständnis der Regulation von *Ac* in heterologen Systemen wie Gerste und für die Verwendung von *Ac*-Gerstenlinien als *Ac*-Transposase-Donoren in Zwei-Komponenten-*Tagging*-Systemen.

Für die Untersuchungen sind Gerstenlinien mit unterschiedlichen nicht-mobilen *Ac*-Elementen (2.5.1) verwendet worden, die durch biolistische Transformation hergestellt worden sind (Koprek *et al.* 1999, Scholz 2000).

Aus Vorarbeiten war bereits bekannt, dass die *Ac*-Gerstenpflanzen in ihrer genomischen DNA mindestens ein Fragment enthalten, das einem *Ac*-Transposase-Konstrukt entspricht. *Ac*-Transposase wird in Gerste transkribiert und teilweise alternativ gespleißt (Friedrich 2001). Darüber hinaus kann die Transposition von *Ds*-Elementen in Gerste durch *Ac*-Transposase induziert werden (Scholz 2000, Scholz *et al.* 2001, Friedrich 2001, Bergmann und Lütticke 2004).

Für die Charakterisierung der *Ac*-Transposase in Gerste wurden Effekte auf unterschiedlichen Regulationsebenen untersucht:

- 3.1 Charakterisierung der Ploidie von *Ac*-Transposase-Gerstenlinien
- 3.2 Analyse der transgenen *Ac*-Transposase-Genorte in Gerste
- 3.3 Untersuchung der Transkriptprozessierung von *Ac*-Transposase in Gerste
- 3.4 Aktivität der *Ac*-Transposase in Gerste

3.1 Charakterisierung der Ploidie von *Ac*-Transposase-Gerstenlinien

Die Charakterisierung von Gerstenlinien ist (*Hordeum vulgare* L.) für die detaillierte Analyse von *Ac*-Transkripten und die Messung der *Ac*-Transposaseaktivität notwendig, sie bildet daher den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

Die Verwendung von bezüglich des *Ac*-Elements homozygoten Pflanzen ermöglicht es, in den Untersuchungen stets von einer definierten und gleichbleibenden Anzahl von transposaseexprimierenden *Ac*-Elementen im Genom der einzelnen Individuen einer Linie auszugehen. Außerdem können auf dieser Grundlage die Gerstenlinien, die konstant die

höchste *Ac*-Transposasemenge aufweisen, für die weiteren Analysen ausgewählt werden. Daher sind zur Standardisierung des Versuchsmaterials für weitere Analysen doppelhaploide *Ac*-Gerstenlinien regeneriert worden.

3.1.1 Versuche zur Regeneration von doppelhaploiden *Ac*-Transposase-Gerstenpflanzen

Doppelhaploide Pflanzen entstehen durch Aufdopplung des Chromosomensatzes aus haploiden Mikrosporen (Olsen 1991) und sollten daher für alle Genorte zwei identische Genkopien enthalten. Die Regeneration aus Mikrosporen ist für das Gerstenkultivar *Igri* bereits etabliert (Olsen 1991, Jähne *et al.* 1994) und ist für Zwecke dieser Arbeit auf das Kultivar ‚*Golden Promise*‘ erfolgreich übertragen und angepasst worden.

Dazu sind insgesamt 96 Pflanzen der *Ac*-Transposase-exprimierenden ‚*Golden Promise*‘-Linien cwAc₁₀₃₋₈₀₇#1, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2, cwAc#3, cwAc#4, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#8 und *UbiAc* sowie der *Igri*-Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9 im Gewächshaus unter optimalen Bedingungen kultiviert worden (2.5.1). Alle Pflanzen sind per PCR auf die Anwesenheit des *Ac*-Elements überprüft worden. Zusätzlich haben Southern-Blot-Analysen zur Auswahl von 39 Gerstenpflanzen als Mikrosporenmutterpflanzen geführt (ohne Abbildung). Mikrosporen sind etwa fünf Monate nach Keimung der Mutterpflanze isoliert worden. Bei *Igri* ist die Ernte der Ähren erfolgt, sobald die Spitzen der Grannen zwei bis drei Millimeter aus dem Fahnenblatt hervorschauen. Bei ‚*Golden Promise*‘ ist das optimale Erntestadium erreicht, wenn die Ährenspitze noch circa 12 bis 13 Zentimeter von der Achsel des Fahnenblattes entfernt, jedoch die Ähre bereits mindestens sieben Zentimeter lang ist (Abbildung 3).

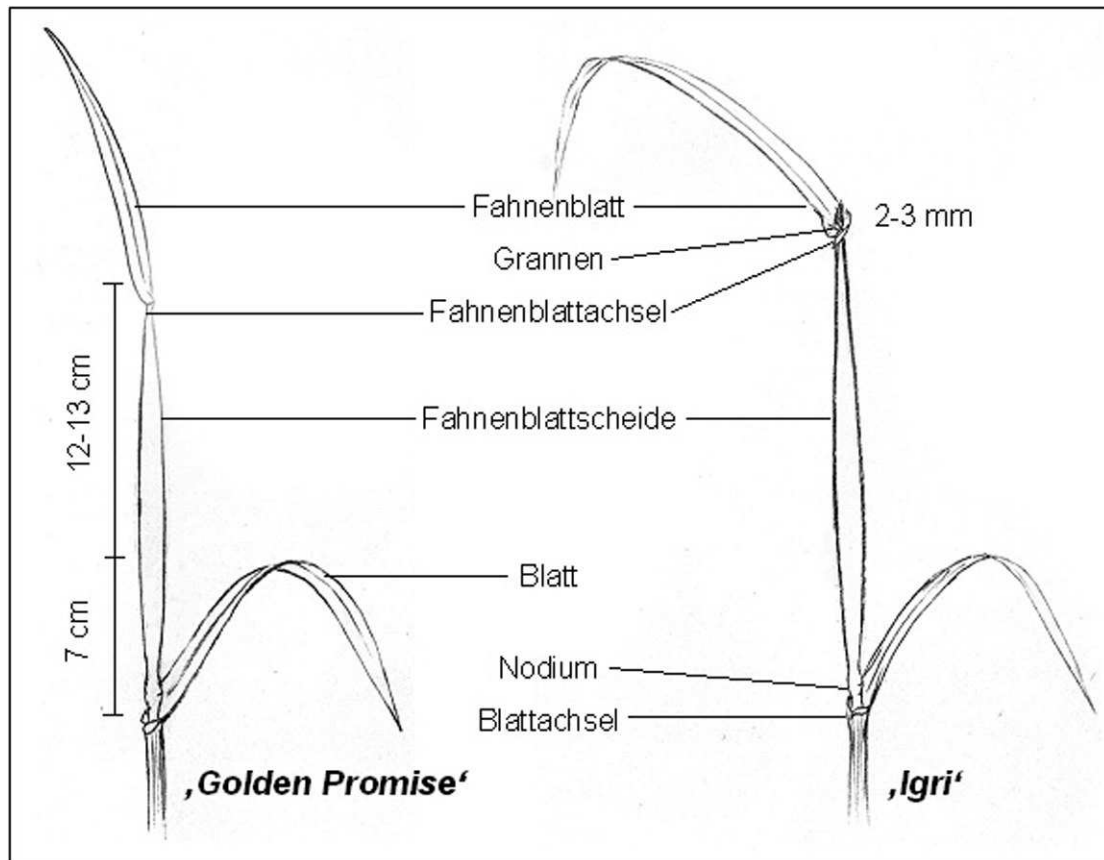


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Gerstenähren der Kultivare ‚Golden Promise‘ und ‚Igri‘ im für die Mikrosporenernte geeigneten Wachstumsstadium

Zum Erreichen der für das Wachstum der Mikrocalli kritischen Mikrosporen-Konzentration mussten jeweils mehrere Ähren von unterschiedlichen Individuen einer Linie gemeinsam isoliert und kultiviert werden.

Für die Induktion der Kallusbildung sind *Igri*-Kulturen auf 150 Mikrosporen pro Mikroliter Hungermedium (K99At4B, Mordhorst und Lörz 1993, 2.25.2) und ‚*Golden Promise*‘-Mikrosporen auf 350-400 pro Mikroliter Hungermedium eingestellt worden.

Von sieben unabhängigen ‚*Golden Promise*‘-Linien konnten fünf erfolgreich regeneriert werden (Tabelle 8). Für das Kultivar *Igri* sind aus einer einzigen Linie Mikrosporen kultiviert worden, was zur erfolgreichen Regeneration von 49 Pflanzen geführt hat.

Tabelle 8: Regeneration doppelhaploider Gerstenpflanzen aus Mikrosporen (MS)

Linie	Anzahl Regenerate	Vitalität der MS in %	Isolierte MS in Mio.	Regenerate pro Mio. MS ²
<i>cwAc₁₀₃₋₈₀₇#1 (GP)</i> ¹	0	73	2,8	-
<i>cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2 (GP)</i>	94	78	4,2	22
<i>cwAc#3 (GP)</i>	39	88	8,1	5
<i>cwAc#4 (GP)</i>	34	74	1,2	28
<i>cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 (GP)</i>	100	82	2,8	36
<i>cwAc₁₀₃₋₈₀₇#8 (GP)</i>	0	91	0,4	-
<i>UbiAc (GP)</i>	10	72	1,1	9
<i>cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9 (Igri)</i>	49	75	6,6	7

¹Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘.

²Die Regeneration ist bei mindestens 10 positiv auf das *Ac*-Element getesteten Regeneraten beendet worden.

Die teilweise geringe Anzahl Regenerate von zehn pro Linie (Tabelle 8) ist darauf zurückzuführen, dass die Regeneration der Gewebekulturen beendet worden ist, sobald für weitere Versuche mindestens zehn per PCR getestete Regenerate vorhanden waren. Nicht alle bei der Mikrosporenkultur erhaltenen embryogenen Kalli sind zu intakten Pflanzen regeneriert worden. Das bedeutet, dass die tatsächlichen Regenerationseffizienzen bei der angewandten Methode höher sind, als die in diesem Versuch erzielten Zahlen von 5-36 Pflanzen pro 10⁶ Mikrosporen für ‚Golden Promise‘-Linien und sieben Pflanzen pro 10⁶ Mikrosporen für *Igri* (Tabelle 8) vermuten lassen.

Auffällig ist dennoch die im Vergleich mit anderen ‚Golden Promise‘-Linien sehr geringe Regenerationseffizienz der Linien *cwAc#3* und *UbiAc* und die völlige Regenerationsunfähigkeit der Mikrosporen der Linien *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#1* und *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#8*.

Die Linie *cwAc#3* zeigt sehr starkes Kalluswachstum, aber nur wenige Regenerate. Das Gewebe ist heller als das Kallusgewebe anderer Linien. Es ist scheinbar wasserhaltiger, bröckeliger und entspricht dem Typ II Kallus (Green *et al.* 1983) bei Mais (*Zea mays* L.). Bei Linie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#1* konnten trotz Kultivierung des Kallusgewebes keine Regenerate erhalten werden. Das Kallusgewebe der Linie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#1* zeigt eine etwas dunklere Färbung als das anderer Linien und entwickelt sich nicht weiter. Die Mikrosporenmutterpflanzen der Linie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#8* bilden zwar mittels FDA-Färbung (2.26) als vital zu erkennende Mikrosporen, es erfolgt jedoch keine Kallusbildung (Tabelle 8). Der Phänotyp der *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#8*-Mikrosporenmutterpflanzen unterscheidet sich vom normalen ‚Golden Promise‘-Phänotyp der anderen Mikrosporenmutterpflanzen. Die Pflanzen der Linie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#8* bilden verdickte

Stängel normaler Länge mit an den Nodien deutlich sichtbarer Anthocyanfärbung, dunklere, teilweise verdrehte Blätter und weniger Seitentriebe als andere Gerstenpflanzen. Bei einzelnen Pflanzen der Linie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#8* erfolgte keine Ährenbildung. Die Mikrosporenmutterpflanzen der ‚*Golden Promise*‘-Linien *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#1*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2*, *cwAc#3*, *cwAc#4*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7* und *UbiAc* sowie der *Igri*-Linie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9* waren zur gleichen Zeit unter gleichen Bedingungen mit den Pflanzen der Linie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#8* im Gewächshaus untergebracht. Sie zeigten einen dem Wildtyp ähnlichen Phänotyp, es kann daher ausgeschlossen werden, dass es sich beim Phänotyp der Linie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#8* um eine kulturbedingte Stresserscheinung handelt.

Bei Linie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9* des Kultivars *Igri* ist die berechnete Anzahl isolierter Mikrosporen von 10^5 pro Ähre trotz etwa durchschnittlicher Mikrosporenvitalität bei der Isolierung etwas höher als der Mittelwert von $6,6 \times 10^4$ beim Kultivar ‚*Golden Promise*‘.

Die aus Mikrosporen regenerierten Gerstenpflanzen und deren Nachkommen der Linien *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2*, *cwAc#3* und *cwAc#4* (Abbildung 4 A) sowie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7*, *UbiAc* und *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9* zeigen einen dem ‚*Golden Promise*‘- bzw. *Igri*-Wildtyp entsprechenden Phänotyp.

Die Regenerate der Linie *cwAc#3* und deren Folgegenerationen zeigen ein gegenüber den anderen Linien verlangsamtes Wachstum und bilden an etwa der Hälfte der Blüten einer Ähre keine Körner, erreichen aber die normale Größe (Abbildung 4 A, links und 4 B). Da bereits die Mikrosporenmutterpflanzen und auch die Folgegenerationen betroffen sind, handelt es sich bei diesem Phänotyp vermutlich nicht um einen Gewebekultureffekt.

In der ersten und zweiten Folgegeneration der Linien *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2*, *cwAc#3*, *cwAc#4*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9* und *UbiAc* treten, abgesehen von der spärlichen Ährenbesetzung der Nachkommen von Linie *cwAc#3* (Abbildung 4 B), keine wesentlichen Veränderungen im Phänotyp der Gerstenpflanzen auf. Das überwiegend normale Wachstum der putativ doppelhaploiden Linien lässt auf eine erfolgreiche Aufdopplung der Chromosomensätze schließen. Der Ploidiegrad der *Ac*-Gerstenpflanzen wird gemessen, um diese Schlussfolgerung zu überprüfen.

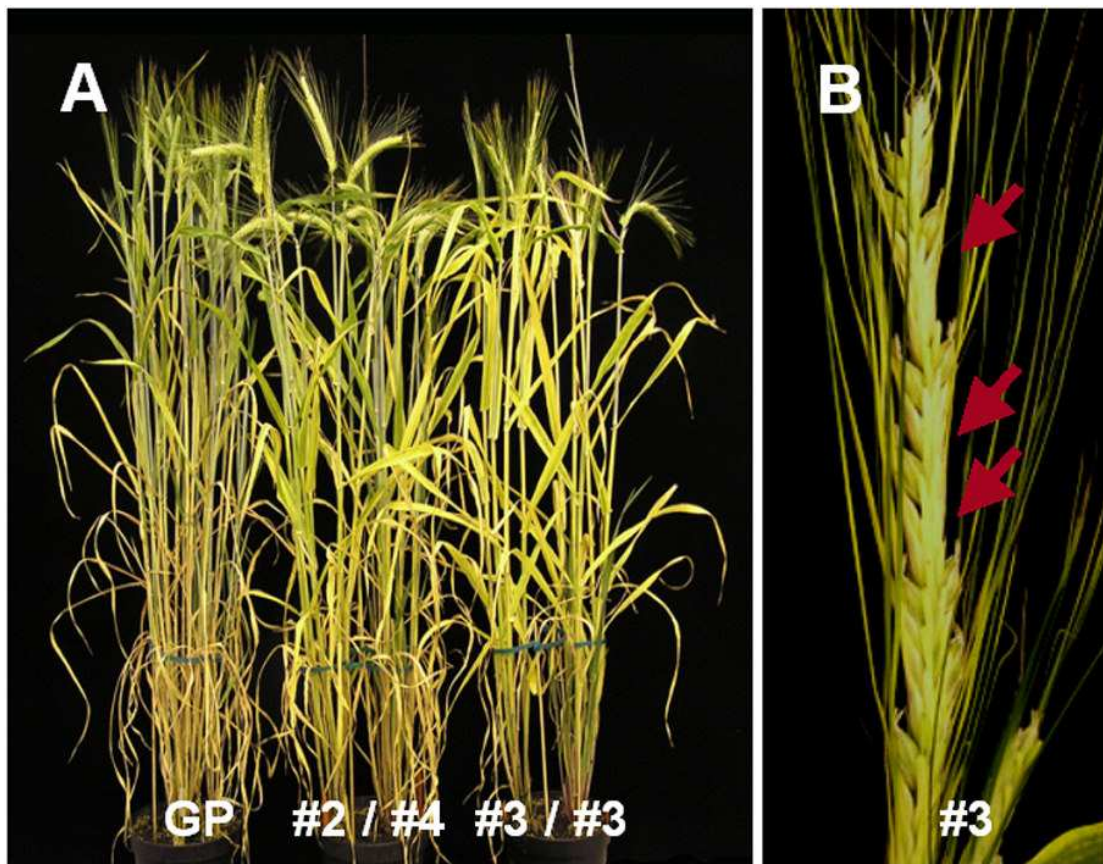


Abbildung 4: Phänotypen der Nachkommen von aus Mikrosporen regenerierten *Ac*- und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Gerstenpflanzen

A) Zwei Pflanzen ‚Golden Promise‘-Wildtyp (links), Nachkommen der Linie cwAc#4 und cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2 (cwAc#4/23 und cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2/27 im mittleren Topf) als transgene Vergleichspflanzen und zwei Nachkommen der Linie cwAc#3 (cwAc#3/8 und cwAc#3/18, rechts).

B) Ähre der Linie cwAc#3 mit teilweise reduziertem Kornansatz.

3.1.2 Nachweis des Ploidiegrads von *Ac*-Transposase-Gerstenpflanzen aus Mikrosporenkultur

Um auszuschließen, dass nach der Regeneration Gerstenpflanzen mit vervielfachten oder verringerten Chromosomensätzen zur Weitervermehrung der Linien ausgesucht werden, wird deren Ploidie durchflusszytometrisch an Blattzellen bestimmt. Zusätzlich wird die Ploidie an Pflanzen der zweiten Nachkommengeneration gemessen, um eventuelle Reduktionen im Ploidiegrad zu verfolgen.

Durch Meiose und Pollenmitose entstandene haploide Mikrosporen verdoppeln bei der Kultivierung ihren Chromosomensatz. Das entstehende Kallusgewebe und die daraus

regenerierbare Pflanze sind doppelhaploid (Olsen 1991). Es kann jedoch bei der Mikrosporenkultur auch vorkommen, dass die Chromosomenanzahl weiter verdoppelt wird, so dass Tetra-, Oktaploide usw. entstehen (Choi *et al.* 2001). Von der Norm abweichende Chromosomenzahlen können bei späteren Zellteilungen zu Wachstumsproblemen und mangelnder Fertilität führen.

Bei der durchflusszytometrischen Messung wird die Ploidie der Zellen durch den DNA-Gehalt der Zellkerne widerspiegelt. Als Referenz für die DNA-Menge diploider Gerstenzellkerne dient Blattmaterial von Wildtyp-Gerstenpflanzen der Kultivare ‚*Golden Promise*‘ und *Igri*. Für jede Linie wird ein per PCR und Southern-Blot-Analysen vorgetestetes Regenerat als Ausgangspflanze ausgewählt. Es sind nach Gewebeaufschluss und DAPI-Färbung pro Messung mindestens 500 Zellkerne ausgewertet worden (Abbildung 5).

Es sind sowohl Blattmaterial der Primärregenerate, das vorher bei -70°C gelagert worden ist, als auch frisches Blattmaterial der zweiten Folgegeneration verwendet worden.

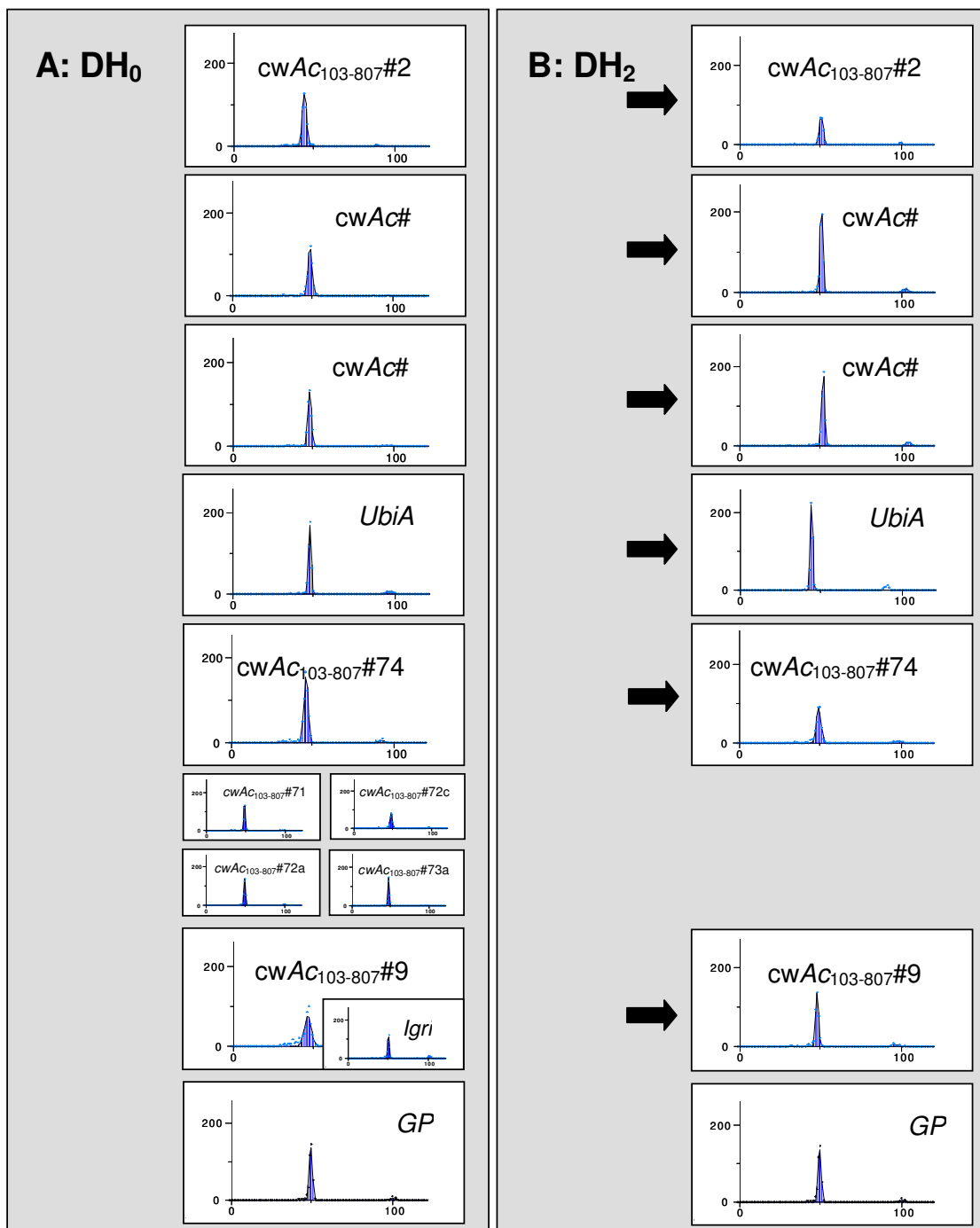


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Ploidiebestimmung von *Ac*-Gerstenpflanzen

DNA-Messkurven für die Regenerate (A) und deren Nachkommen der zweiten Folgegeneration (B). Frisches Blattmaterial der Kultivare ‚Golden Promise‘ (unten) und *Igri* (Einschub bei Linie *cwAC*₁₀₃₋₈₀₇#9) dient als Kontrolle. Pro Messung sind mindestens 500 Partikel ausgewertet worden. Die Abszisse (x-Achse) zeigt die relative DNA-Menge und die Ordinate (y-Achse) die Anzahl Partikel.

Aus der Übereinstimmung der gemessenen DNA-Mengen aller Linien mit denen der ‚Golden Promise‘- und *Igri*-Kontrollen (Abbildung 5) wird ersichtlich, dass die Zellen der Primärregenerate ebenso wie die von deren Nachkommen alle diploid sind. Somit kann die Regeneration als erfolgreich eingestuft werden, sie hat für fünf ‚Golden Promise‘-Linien und eine *Igri*-Linie fertile putativ doppelhaploide Pflanzen mit normalen Phänotypen hervorgebracht.

3.1.3 Überprüfung der Doppelhaploidität mittels eines PCR-basierten *Ac*-Schnelltests

Die putativ doppelhaploiden Gerstenlinien sind mittels eines PCR-basierten Schnelltests auf die Anwesenheit des *Ac*-Elements untersucht worden, um zu überprüfen, ob es sich bei den diploiden Pflanzen tatsächlich um doppelhaploide Linien handelt. Bei erfolgreicher Regeneration doppelhaploider *Ac*-Gerstenlinien aus Mikrosporen sollten alle Nachkommen der positiv auf *Ac* getesteten Regenerate ebenfalls das *Ac*-Element enthalten.

Das Vorhandensein von mindestens einer Kopie des *Ac*-Elements in der genomischen DNA der Pflanzen kann mittels spezifischer Amplifikation eines Genomfragments festgestellt werden. Es ist dazu ein PCR-Schnelltest etabliert worden (2.15.1), bei dem ein 340 bp langes *Ac*-spezifisches Fragment mit den Primern *cwAH2-5* und *cwAH2-6* amplifiziert wird (Abbildung 6). Als Kontrolle für das Vorhandensein amplifizierbarer DNA dient die gleichzeitige Amplifikation eines 537 bp-Fragments aus dem *waxy*-Gen mit den Primern *Hv-waxy1* und *Hv-waxy2*. Pflanzen mit dem *Ac*- oder *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Element (Abbildung 6, Spuren 2 bis 8) weisen zwei Amplifikate auf, Pflanzen ohne *Ac*-Elemente (Abbildung 6, Spuren 1 und 9 bis 12) weisen nur eines auf.

Es sind insgesamt drei Gerstengenerationen untersucht worden, um das Vorhandensein des integrierten *Ac*-Elements im Gerstengenom zu überprüfen (Tabelle 9), davon 181 aus Mikrosporen regenerierte Pflanzen, 67 der Nachkommen der ersten und 43 Nachkommen der zweiten Generation der Linien *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#2, *cwAc*#3, *cwAc*#4, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#7, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#9 und *UbiAc*.

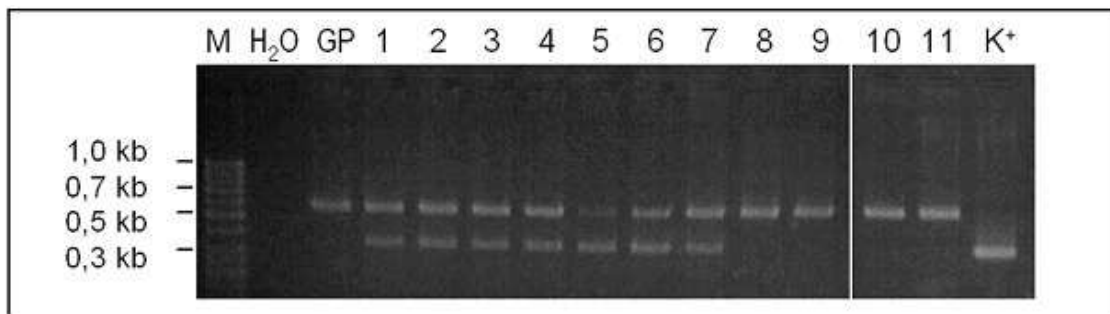


Abbildung 6: Exemplarische gelelektrophoretische Auftrennung von mittels PCR-Schnelltest gewonnenen DNA-Fragmenten

PCR-Test (2.15.1) an 100 ng genomischer DNA der aus Mikrosporen regenerierten Pflanzen (Spuren 1 bis 11). Größenmarker 0,5 µg 50 bp-Ladder (Spur M, 2.2.2). Beispiele für Gerstenpflanzen mit *Ac* oder *Ac*₁₀₃₋₈₀₇ (Spuren 1 bis 7) und ohne (Spuren 8 bis 11). Eine der Negativkontrollen (H₂O) beinhaltet statt DNA nur Wasser, die andere (GP) den PCR-Ansatz mit genomischer DNA des Kultivars ‚*Golden Promise*‘. Die Positivkontrolle (K⁺) enthält den PCR-Ansatz mit 25 ng des Plasmids pAH2.

Tabelle 9: Vorkommen der *Ac*-Elemente in Regeneraten und ihren Nachkommen der ersten und zweiten Folgegeneration

Linie	Generation	Per PCR getestet	Vorkommen von <i>Ac</i> in %
<i>cwAc</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #2 (GP)	Regenerate	49	67
	1. Folgegen.	22	100
	2. Folgegen.	17	100
<i>cwAc</i> #3 (GP)	Regenerate	19	21
	1. Folgegen.	16	56
	2. Folgegen.	13	54
<i>cwAc</i> #4 (GP)	Regenerate	25	64
	1. Folgegen.	7	100
	2. Folgegen.	8	100
<i>cwAc</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #7 (GP)	Regenerate	69	98
	1. Folgegen.	40	98
	2. Folgegen.	26	85
<i>UbiAc</i> (GP)	Regenerate	10	80
	1. Folgegen.	14	57
<i>cwAc</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #9 (<i>Igri</i>)	Regenerate	14	100
	1. Folgegen.	8	100
	2. Folgegen.	5	100

Für die Linien *cwAc#3* und *UbiAc* ist in den Folgegenerationen das *Ac*-Element nur in circa 50 Prozent der Individuen zu detektieren. Diese Linien sind nicht doppelhaploid. Die ‚*Golden Promise*‘-Linie *cwAc#3* weist bei der Mikrosporenkultur das *Ac*-Element in nur 21% in den getesteten Regeneraten auf (Tabelle 9).

Die Linien *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2*, *cwAc#4* und *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9* beinhalten in den Nachfolgegenerationen zu 100% das *Ac*-Element, somit kann die Doppelhaploidisierung dieser Linien als erfolgreich betrachtet werden. Im Folgenden werden diese Linien daher mit *DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#2*, *DHcwAc#4* und *DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#9* bezeichnet.

Bei den beiden erfolgreich regenerierten ‚*Golden Promise*‘-Linien *DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#2* und *DHcwAc#4* befindet sich der Anteil an Regeneraten mit dem *Ac*-Element zwischen 64 und 67%. Bei der *Igri*-Linie *DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#9* sind 100% der Regenerate transgen (Tabelle 9).

3.2 Analyse der transgenen *Ac*-Transposase-Genorte in Gerste

Ziel dieses Teilexperimentes ist es, in Gerstenlinien vollständige Wildtyp-*Ac*- oder *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Elemente unter Kontrolle des *Ac*- bzw. des *Ubiquitin1*-Promotors mittels PCR- und Southern-Blot-Analysen zu detektieren und so die Anzahl integrierter *Ac*-Elementkopien zu bestimmen. Zur Herstellung der primärtransgenen Vorfahren der Mikrosporenmutterpflanzen (Scholz 2000) sind die *Ac*-Elemente bzw. *Ac*-Elementderivate auf den Plasmiden p*JAc* und p*AH2* (2.4) verwendet worden. Die *UbiAc*-Linien (Koprek *et al.* 2000) enthalten das Konstrukt p*BS-codA-Act-UbiAc* (2.4).

Für die Expression der *Ac*-Transposase ist notwendig, dass der Genort das intakte Gen einschließlich eines Promotors und des Polyadenylierungssignals enthält. Die Intaktheit der transformierten Gensequenz ist bei der Transformation mit Mikroprojektilen nicht gewährleistet, da während der Transformation Umarrangements der eingebrachten Gensequenzen stattfinden können (Pawlowski und Somers 1998).

Zur Untersuchung der Genorte in den vorab auf das *Ac*-Element getesteten Gerstenlinien (3.1) sind Restriktionen der genomischen DNA durchgeführt worden. Mit den Enzymen *PacI* und *BamHI* kann das vollständige Element in einem Fragment spezifischer Länge aus dem pflanzlichen Genom exzisiert werden. Mit Enzymen, die nur einmal im Element und an variablen Stellen im Genom restringieren, ist es über die unterschiedliche Länge der Fragmente möglich, die Anzahl *Ac*-Elemente pro haploidem Genom festzustellen. Es werden zur Detektion zwei DIG-markierte Sonden (2.3) verwendet, von denen eine nahe am 5'-Ende im zweiten Exon (Position 1043-1777) und die andere nahe am 3'-Ende (Position 2992-3571) des *Ac*-Elements bindet.

Zusätzlich sind Teile der *Ac*-Sequenzen im Gerstengenom durch PCR-basierte Techniken überprüft worden.

3.2.1 Überprüfung des *Ac*-Konstrukttyps und dessen Immobilisierung in transgenen Gerstenlinien

Um zu überprüfen, ob die Gerstenlinien das cw*Ac*- oder das cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Element enthalten, ist mit den Primern cw*Ds-1* und cw*Ds-2* (2.2.3) der Teil des 5'-Endes dieser *Ac*-Elemente amplifiziert worden, in dem sie sich unterscheiden (Position 734 bis 1504 im Wildtyp-*Ac*-

Element). Bei den *cwAc*-Linien wird ein spezifisches Fragment von 771 Basenpaaren und bei den *cwAc₁₀₃₋₈₀₇*-Linien ein Fragment von 355 Basenpaaren amplifiziert.

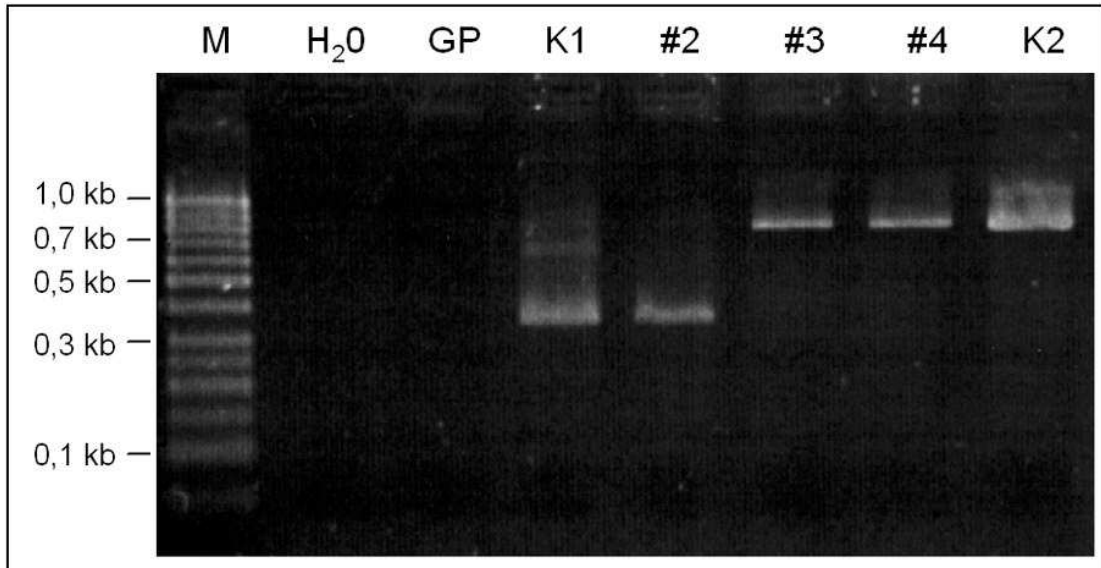


Abbildung 7: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikation des 5'-Endes von *Ac* in Gerstenlinien

PCR mit jeweils 50 ng genomischer DNA von Pflanzen der Linien DH*cwAc₁₀₃₋₈₀₇*#2, *cwAc*#3, DH*cwAc*#4, Marker 50 bp-Ladder (2.2.2), Negativkontrollen ohne Template (H₂O) und mit ‚*Golden Promise*‘-DNA (GP) und Positivkontrollen mit den Plasmiden *pJac* (K1) und *pAH2* (K2) (2.3).

In Abbildung 7 ist deutlich der Größenunterschied von ca. 400 Basenpaaren zwischen dem Fragment in der Linie DH*cwAc₁₀₃₋₈₀₇*#2 und den Fragmenten in den Linien *cwAc*#3 und DH*cwAc*#4 zu sehen. Der Sequenzunterschied von 416 Basenpaaren liegt innerhalb der spezifisch amplifizierten Sequenz am 5'-Ende (Position 734 bis 1504) der *Ac*- und *Ac₁₀₃₋₈₀₇*-Elemente. In den Linien *cwAc*#3 und DH*cwAc*#4 ist somit das Wildtyp-*Ac*-Element und in der Linie DH*cwAc₁₀₃₋₈₀₇*#2 entsprechend die Deletionsvariante nachgewiesen worden.

Es ist überprüft worden, ob das jeweilige *Ac*-Element nach Einbringen in die Linien tatsächlich am 5'-Ende noch die für die Immobilisierung wichtige Deletion von fünf Basen (Healy *et al.* 1993) aufweist oder ob bei der Transformation Sequenz-Umarrangements und Basenveränderungen (Pawlowski und Somers 1998) in diesem Bereich stattgefunden haben. Amplifiziert wurde mit den Primern *pBR1* und *Ac12* (2.2.3) ein 701 Basenpaare umfassendes Fragment, das 188 Basenpaare flankierende Sequenzen aus dem Transformationsvektor (2.4) sowie 513 Basenpaare des 5'-Endes des *Ac*-Elements enthält. Die amplifizierten Fragmente

sind kloniert, aufgereinigt und sequenziert worden (2.16.1). Diese Ergebnisse sind mit der Sequenz des Vektors pJAc verglichen worden, der das Wildtyp-Ac-Element in einem Fragment des *waxy*-Gens aus Mais (*Zea mays* L.) enthält (2.4).

Tabelle 10: Ergebnisse der Sequenzierung der 5'-TIR der Ac- und Ac₁₀₃₋₈₀₇-Gerstenlinien

Linie	Sequenzierungsergebnis Positionen 8185 bis 19 im Vektor pJAc
Vektor pJAc	5'-GCGTTGCGTGACC CAGGGATGAAA GTAGGATGGGA-3'
DHcwAc ₁₀₃₋₈₀₇ #2	5'-GCGTTGCGTGACC- - - - ATGAAA GTAGGATGGGA-3'
cwAc#3	5'-GCGTTGCGTGACC- - - - ATGAAA GTAGGATGGGA-3'
DHcwAc#4	5'-GCGTTGCGTGACC- - - - ATGAAA GTAGGATGGGA-3'
cwAc ₁₀₃₋₈₀₇ #7	5'-GCGTTGCGTGACC- - - - ATGAAA GTAGGATGGGA-3'
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> waxy Ac </div>

Die Auswertung der Sequenzdaten ergibt für alle cwAc- und cwAc₁₀₃₋₈₀₇-Linien untereinander übereinstimmende Sequenzen (Tabelle 10). Bei allen sind die ersten fünf Basen das Wildtyp-Ac-Elements deletiert. Somit ist gezeigt, dass die im Gerstengenom vorhandenen Ac-Elemente nicht transpositionsfähig sind (Healy *et al.* 1993).

3.2.2 Bestimmung der Anzahl von ins Gerstengenom integrierten Ac-, Ac₁₀₃₋₈₀₇- und UbiAc-Elementkopien

Es sind 105 der vorab per PCR-Schnelltest untersuchten regenerierten Pflanzen (3.1) zusätzlich per Southern-Blot analysiert worden. Pro Linie ist eine charakterisierte Pflanze für die Aussaat von Nachkommenpflanzen ausgewählt worden. Von den Nachkommenpflanzen sind nach PCR-Vorselektion insgesamt 84 per Southern-Blot genauer charakterisiert worden. Für die Analysen sind jeweils 12 µg genomischer DNA mit den Enzymen *Bam*HI, *Hind*III oder *Xba*I restringiert worden (2.10). Das in Eukaryoten methylierungssensitive Restriktionsenzym *Bam*HI liefert für die Ac-, Ac₁₀₃₋₈₀₇- und UbiAc-Gerstenlinien charakteristische Bandenmuster. *Hind*III und *Xba*I sind nicht methylierungssensitiv (2.10). Restriktionsanalysen mit diesen Enzymen sind pro Linie an bis zu acht der vorab mit *Bam*HI analysierten Pflanzen durchgeführt worden.

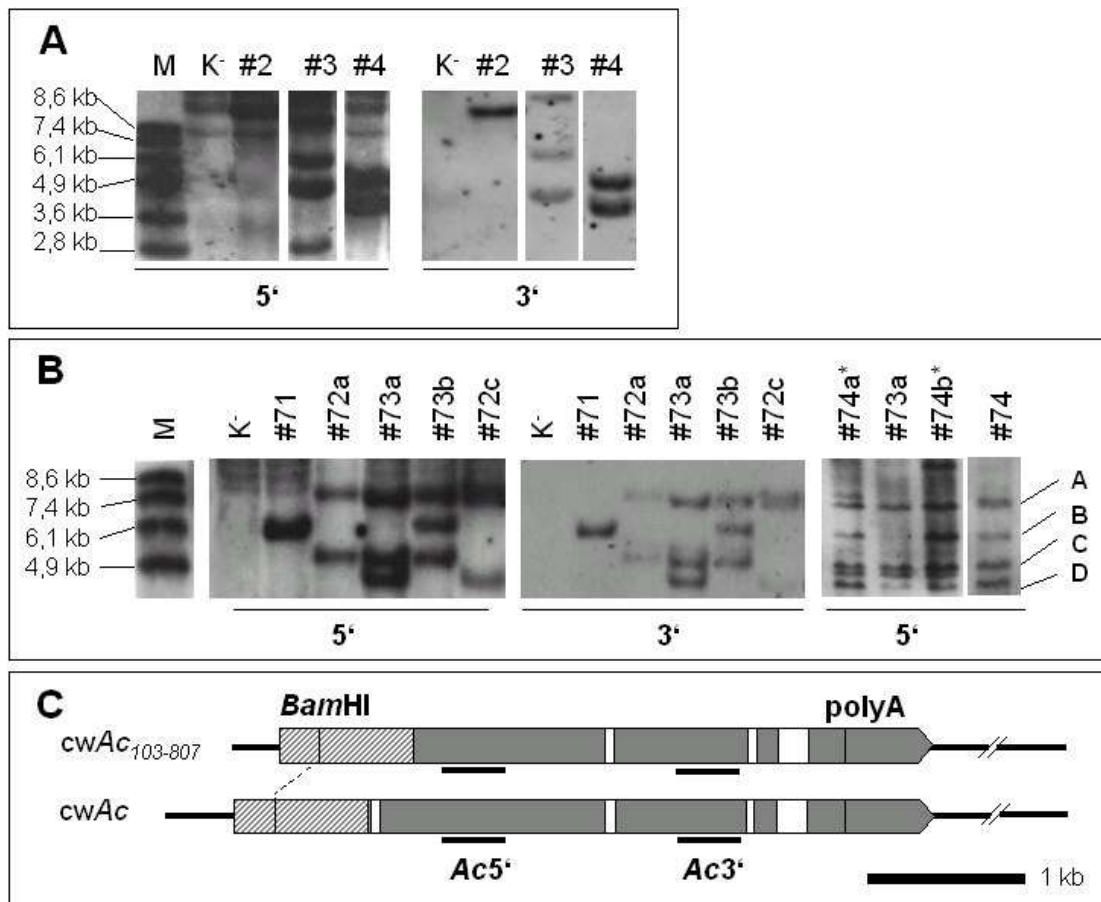


Abbildung 8: Restriktion der *Ac*-Genorte mit *Bam*HI

Restriktion von 12 µg genomischer DNA der *Ac*-, *Ac*₁₀₃₋₈₀₇- und *UbiAc*-Linien mit *Bam*HI:

A) Erste Nachkommengeneration: ‚*Golden Promise*‘ (Spur K⁻), DH*cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#21/51 (Spur #2), *cwAc*#34/42 (Spur #3) und DH*cwAc*#42/43 (Spur #4). Hybridisierung mit Sonde *Ac*5' (links, 2.3) bzw. Sonde *Ac*3' (rechts, 2.3).

B) Regenerate: ‚*Golden Promise*‘ (Spur K⁻), *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#74/N3 (Spur #74), *cwAc*#73a/O1 (Spur #73a), *cwAc*#71/O2 (Spur #71), *cwAc*#74/x6 (Spur #74*), *cwAc*#73a/x7 (Spur #73a) und *cwAc*#74/x8 (Spur #74*). Hybridisierung mit Sonde *Ac*5' (2.3, rechts). Ein Sternchen (*) kennzeichnet Bandenmuster, die eventuell durch Methylierung der Restriktionsstelle zustande gekommen sind.

Erste Nachkommengeneration: ‚*Golden Promise*‘ (Spur K⁻), *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#71/5/1 (Spur #71), *cwAc*#72a/3 (Spur #72a), *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a/17 (Spur #73a), *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73b/5/2 (Spur #73b) und *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72c/4/2 (Spur #72c). Hybridisierung mit Sonde *Ac*5' (links, 2.3) bzw. Sonde *Ac*3' (mitte, 2.3).

C) Schematische Darstellung der *Ac*- und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Konstrukte. Der Balken stellt das Konstrukt dar. Der *Ac*-Promotor wird durch eine dicht schraffierte Box dargestellt. Weiße Boxen symbolisieren Introns. Die unterstrichenen Bereiche deuten die Bindungsstellen der Sonden *Ac*5' und *Ac*3' an. Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 1 kb.

*Bam*HI restringiert 109 bp 5' der TATA-Box im *Ac*-Promotor. Das *Ac*-spezifische *Bam*HI-Restriktionsfragment wird mit beiden spezifischen Sonden *Ac*5' und *Ac*3' (2.3) detektiert (Abbildung 8). Ein *Bam*HI-Restriktionsfragment mit einer Mindestlänge von 3,7 kb für *Ac*₁₀₃₋₈₀₇, von 4,1 für *Ac* und 4,7 kb für *UbiAc* zeigt also, dass der *Ac*-Transposase-Promotor mindestens in der verkürzten aktiveren Form im Genom der Gerstenpflanzen vorliegt. Fragmente unter 4,1 kb für *cwAc*, 3,7 kb für *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ und 4,7 kb für *UbiAc* enthalten kein vollständiges Fragment und sind möglicherweise auf während der Transformation mittels Partikelbeschuss umarrangierte Sequenzen zurückzuführen (Pawlowski und Somers 1998).

Die Anzahl und Größe der bei der Restriktion mit dem Enzym *Bam*HI erhaltenen Fragmente (Abbildung 8) sind in Tabelle 11 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 11: *Bam*HI-Restriktionsfragmente der *Ac*-Genorte in Regeneraten und Nachkommenpflanzen mit den Sonden *Ac*5' und *Ac*3'

Linie	<i>Ac</i> 5'-Fragmente in kb	Anz. Fragm. ¹ (Regenerate)	Anz. Fragm. (Nachkommen)	<i>Ac</i> 3'-Fragmente in kb
DHcw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #2	hm ^{2,3}	1	1	hm
cw <i>Ac</i> #3	hm ; hm; 6; 5; [3] ⁴	4	2	hm ; 6,5; 5
DHcw <i>Ac</i> #4	5,5; 4,2	2	2	5,5; 4,2
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #74	7; 6; 4,7; 4,2	4	4	7; 6; 4,7; 4,2
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #73a	7 ---⁵ 4,7; 4,2	3	3	7 --- 4,7; 4,2
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #73b	7; 6; 4,7 ---	3	3	7; 6; 4,7 ---
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #72c	7 --- --- 4,2	nb ⁶	2	7 --- --- 4,2
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #72a	7 --- 4,7 ---	nb	2	7 --- 4,7 ---
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #71	--- 6 --- ---	1	1	--- 6 --- ---
<i>UbiAc</i>	hm; 7; 6,5	3	nb	nb

¹Die Fragmentanzahl ist in den Regeneraten durch Hybridisierung mit Sonde *Ac*5' bestimmt worden, in den Nachkommen mit den Sonden *Ac*5' und *Ac*3'.

²Fett gedruckt sind die Größen der Fragmente, die jeweils mit beiden Sonden hybridisieren.

³Bande hohen Molekulargewichts

⁴ Fragment, dessen Molekulargewicht zu gering ist, um ein intaktes *Ac*-Elemente zu enthalten.

⁵Abwesende Fragmente sind durch einen Platzhalter (---) angedeutet.

⁶nicht bestimmt

Die Größen der Fragmente in den regenerierten Linien (Abbildung 8, Tabelle 11) entsprechen denen der in Voranalysen in Mikrosporenmutterpflanzen detektierten Fragmente.

In Linie DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#2 hybridisieren beide Sonden mit einem hochmolekularen Fragment. Linie cwAc#3 enthält ein kurzes Fragment von ca. 3 kb (Abbildung 8, Tabelle 11), dem möglicherweise ein umarrangierter bzw. verkürzter Genort zugrunde liegt. Bei Linie cwAc#3 hybridisieren nur drei der fünf Kopien mit beiden Sonden, davon ist eine in ihrer Größe versetzt, so dass vermutlich nur zwei davon intakt sind (Abbildung 8, Tabelle 11).

Linie cwAc#4 enthält zwei Fragmente, die mit beiden Sonden hybridisieren.

Anhand der Restriktionsmuster wurde Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 in mehrere Sublinien aufgespalten. Bei den Regeneraten der Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 und deren Nachkommen (Abbildung 8B, Tabelle 11) werden die vier ursprünglich in den Mikrosporenmutterpflanzen enthaltenen Ac-Fragmente teilweise unabhängig von einander vererbt. Eine Analyse der Segregation dieser Fragmente ist durchgeführt worden (Abschnitt 3.2.5.2).

Bei Southern-Blot-Analysen einiger Pflanzen der Gerstenlinie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 mit *Bam*HI treten neben den von Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#74 abgeleiteten Mustern teilweise zusätzliche Banden auf (Abbildung 8B, Spur #74*). Das Restriktionsenzym *Bam*HI ist methylierungssensitiv. Dies spricht dafür, dass das veränderte Restriktionsmuster damit zusammenhängt, dass die methylierten Restriktionsstellen in der genomischen DNA nicht restringiert worden sind und sich so eine Verschiebung der Fragmente hin zu höheren Molekulargewichten ergibt. Dass die Restriktion der betreffenden DNA-Proben erfolgreich stattgefunden hat und das veränderte Restriktionsmuster nicht auf experimentelle Abweichungen zurückzuführen ist, ist anhand der gelelektrophoretischen Auftrennung optisch überprüft (2.20.1) und festgestellt worden.

Um die Analyse der transgenen Ac-Genorte mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI zu ergänzen, und abzusichern, sind weitere Restriktionsanalysen mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Xba*I durchgeführt worden.

Alle drei Transformationskonstrukte enthalten zwei *Hind*III-Restriktionsstellen im Ac-Element und eine zusätzlich im Transformationsvektor (Abbildung 9B). Die Restriktion mit *Hind*III und anschließende Hybridisierung mit der Sonde Ac5' liefert für die verwendeten Ac-, Ac₁₀₃₋₈₀₇- und *UbiAc*-Konstrukte (2.4) Fragmente von 5255, 4843 bzw. 5300 Basenpaaren. Bei Integration der Konstrukte ins Gerstengenom können Fragmente von 1,8 kb für cwAc, 1,5 kb für cwAc₁₀₃₋₈₀₇ und 2,8 kb für *UbiAc* den Ac- oder *Ubiquitin1*-Promotor sowie die jeweilige Ac- oder Ac₁₀₃₋₈₀₇-Sequenz bis zur *Hind*III-Restriktionsstelle enthalten. Kürzere Fragmente können kein vollständiges Element enthalten, sondern sind möglicherweise darauf

zurückzuführen, dass während der Transformation mittels Partikelbeschuss Sequenzen umarrangiert worden sind (Pawlowski und Somers 1998).

Die Ergebnisse der *Hind*III-Southern-Blot-Analysen (Abbildung 9A) sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

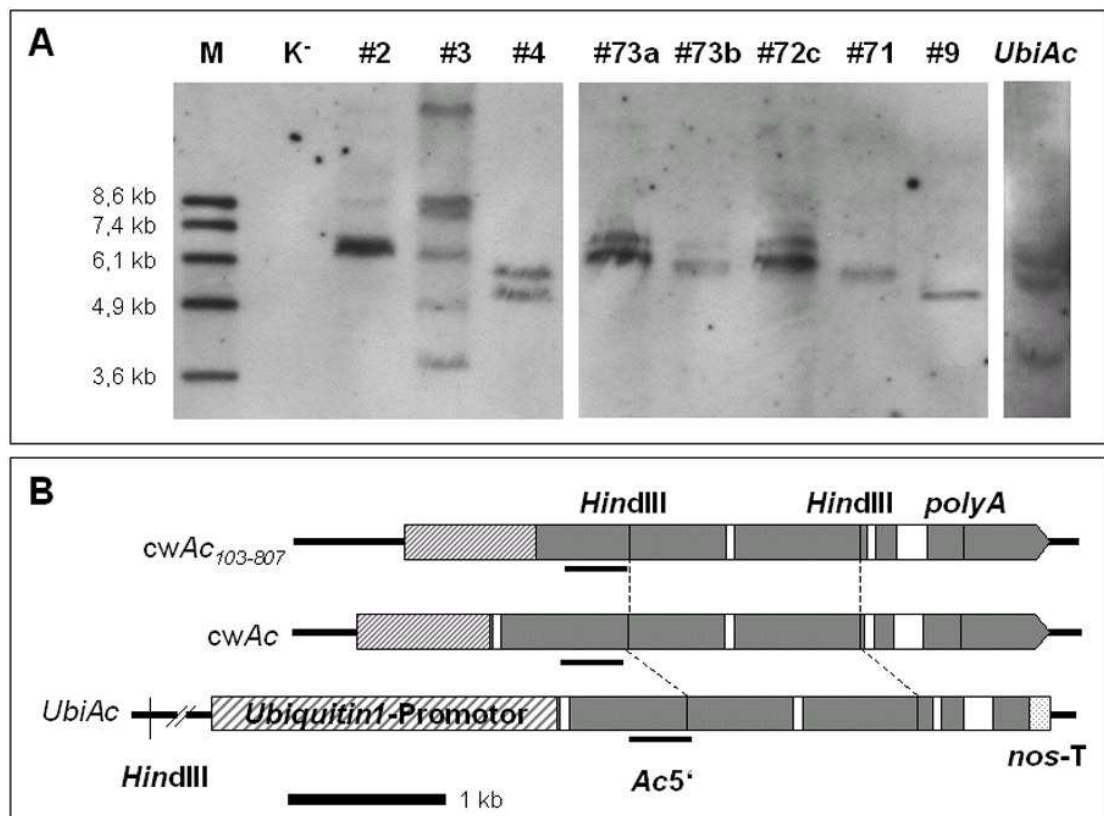


Abbildung 9: Restriktion der *Ac*-Genorte mit *Hind*III

Restriktion von 12 µg genomischer DNA der *Ac*-, *Ac*₁₀₃₋₈₀₇- und *UbiAc*-Linien mit *Hind*III:

A) DIG-Marker VII 0,3 µg (Spur M), ‚Golden Promise‘ (Spur K⁻), DHcw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#2/W2 (Spur #2), cw*Ac*#3/R1 (Spur #3), DHcw*Ac*#4/V4 (Spur #4), cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73a/Z3 (Spur #73a), cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73b/Z7 (Spur #73b), cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#72c/Z1 (Spur #72c), cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#71/O3 (Spur #71), cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#9/p6 (Spur #9) und *UbiAc*#1 (Spur *UbiAc*). Hybridisierung mit Sonde *Ac*5' (2.3).

B) Schematische Darstellung der *Ac*-, *Ac*₁₀₃₋₈₀₇- und *UbiAc*-Konstrukte. Der Balken stellt das jeweilige Konstrukt dar. Der *Ac*-Promotor wird durch eine dicht schraffierte Box, der *Ubiquitin1*-Promotor durch eine weit schraffierte Box dargestellt. Weiße Boxen symbolisieren Introns. Die unterstrichenen Bereiche deuten den Bindungsbereich der Sonde *Ac*5' (2.3) an. Der *nos*-Terminator ist als gepunktete Box dargestellt. Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 1 kb.

Tabelle 12: *Hind*III-Restriktionsfragmente der *Ac*- Genorte in den Nachkommen

Linie	<i>Ac</i> 5'-Fragmente in kb	Anz. Fragmente
DHcw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #2	6,2	1
cw <i>Ac</i> #3	hm ¹ ; 9; 8; 6; 5 und 4,2	6
DHcw <i>Ac</i> #4	5,5 und 5	2
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #74	6,5 und 5,7	2
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #73a	6,5 und 5,7	2
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #73b	6,5 und 5,7	2
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #72c	6,5 und 5,7	2
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #71	5,7	1
DHcw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #9	5	1
<i>Ac</i>	6; 5,3 und 4	3

¹Bande hohen Molekulargewichts

Die Anzahl der in der Southern-Blot-Analyse mit *Hind*III detektierten Fragmente stimmt mit der von *Bam*HI bei den unabhängigen Linien DHcw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#2, DHcw*Ac*#4 und *UbiAc* überein.

Für die Sublinien der Linie cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#7 können im Gegensatz zu der *Bam*HI-Restriktionsanalyse mit Sonde *Ac*3' nur zwei Fragmente detektiert werden. Die beiden *Hind*III-Fragmente der Linie cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#74 können getrennt vererbt werden.

Durch Rekombination der Plasmidsequenzen während der Transformation können die Elementsequenzen umarrangiert werden; dabei kann als einfachste Variante eine Tandemwiederholung des Transformationskonstruktes entstehen (Pawlowski und Somers 1998). Hinter *Hind*III-Fragmenten von mindestens 4,8 kb verbergen sich bei cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇ möglicherweise solche Tandemwiederholungen. Dafür spricht auch, dass die Hybridisierungssignale der 5,7-kb-Banden bei cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73a und cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#72c intensiver als die der 6-kb-Banden der jeweils gleichen Proben (Abbildung 9A) sind.

Ergänzend sind Restriktionen mit dem Enzym *Xba*I durchgeführt worden (ohne Abbildung, Tabelle 13). Die Restriktionsstelle des Enzyms *Xba*I liegt an Position 3425 im 3'-Bereich des *Ac*-Elements. Das Minimalfragment umfasst 3,2 kb in *Ac* bzw. 2,8 kb in *Ac*₁₀₃₋₈₀₇.

UbiAc hat zwei *Xba*I-Restriktionsstellen, so dass aus dem intakten Transformationsvektor immer ein Fragment von ca. 8,7 kb entstünde, das mit der Sonde *Ac*5' hybridisiert, und ein

2,4 kb langes Fragment; daher ist bei der Linie *UbiAc* mit dem Enzym *XhoI* restringiert worden, dessen Schnittstelle im vierten Exon von *Ac* liegt (ohne Abbildung).

Die *XhoI*-Restriktionsanalyse der *UbiAc*-Genorte in Mikrosporenmutterpflanzen ergibt nach Hybrisierung mit der Sonde *Ac5'* Fragmente mit Längen von 9, 7,5 und 3 kb, wobei das 3-kb-Fragment vermutlich kein vollständiges *UbiAc*-Element enthält.

Tabelle 13: *XbaI*-Restriktionsfragmente der *Ac*-Genorte in der ersten Nachkommen-Generation

Linie	<i>Ac5'</i> -Fragmente in kb	Anz. Fragmente
DHcw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #2	ca. 10	1
cw <i>Ac</i> #3	8; 6,5 und 4	3
DHcw <i>Ac</i> #4	hm, 8	2
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #74	hm, 7,4, 5 und 3,2	4
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #73a	hm, --- ¹ , 5 und 3,2	3
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #73b	hm, 7,4, --- und 3,2	3
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #72c	hm, ---, 5, und 3,2	3
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #71	---, 7,4	1
DHcw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #9	hm	1

¹Abwesende Fragmente sind durch einen Platzhalter (---) angedeutet.

Die Restriktionsanalyse mit *XbaI* (Tabelle 13) oder *XhoI* ergibt für die Linien ähnliche Integrationszahlen wie die Restriktionsanalyse mit *BamHI*, so dass sich folgende Übersicht in Tabelle 14 ergibt:

Tabelle 14: Übersicht über die Anzahl der bei Southern-Blot-Analysen mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I detektierten *Ac*-Fragmente

Linie	Anzahl <i>Bam</i> HI-Fragm.	Anzahl <i>Hind</i> III-Fragm.	Anzahl <i>Xba</i> I-Fragm.
DHcw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #2	1	1	1
cw <i>Ac</i> #3	2	6	3
DHcw <i>Ac</i> #4	2	2	2
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #74	4	(2)	4
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #73a	3	(2)	3
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #73b	3	(2)	3
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #72a	2	nb	nb
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #72c	2	2	3
cw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #71	1	1	1
DHcw <i>Ac</i> ₁₀₃₋₈₀₇ #9	nb	1	1
<i>UbiAc</i>	3	3	nb

Zusammenfassend formuliert, zeigt Tabelle 14 für die Linien DHcw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#2 und DHcw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#9, dass sie eine Kopie enthalten. Die Linien cw*Ac*#3 und DHcw*Ac*#4 haben jeweils zwei, *UbiAc* hat drei pro haploidem Genom und die Sublinien von Linie cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#7 beinhalten maximal vier Kopien (Tabelle 14).

Bei der Restriktion genomischer DNA der Linien cw*Ac*#3, cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#7 und *UbiAc* mit den Enzymen *Bam*HI, *Hind*III und *Xba*I (Tabelle 14) treten teilweise für dieselbe Pflanze unterschiedliche Ergebnisse auf. Während der biolistischen Transformation auftretende Umarrangements der transgenen *Ac*-Fragmente oder deren unvollständige Integrationen ins Genom (Pawlowski und Somers 1998) der Gerstenlinien können diese Inkonsistenzen erklären.

Die Nachkommen der Linie cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#7 zeigen mit *Bam*HI bis zu vier Fragmente, wovon jedoch nur zwei auch mit *Hind*III detektiert werden können. Diese Fragmente werden teilweise unabhängig voneinander vererbt (Abschnitt 3.2.5.2).

3.2.3 Bestimmung der Vollständigkeit von ins Gerstengenom integrierten *Ac*- und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Elementkopien

Bei einer Doppelrestriktion von *Ac* und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇ mit den Restriktionsenzymen *Pac*I und *Bam*HI entsteht je ein spezifisches Fragment von 4,1 bzw. 3,7 kb. Es umfasst die 109 bp des Promotors; die als Minimalpromotor ausreichen, um die *Ac*-Transposase zu transkribieren (Fridlender *et al.* 1998) sowie das gesamte Gen bis zum putativen Polyadenylierungssignal 5'-ATTAAT-3' (Position 4298 bis 4303 im *Ac*-Element), das innerhalb des *Pac*I-Konsensuspalindroms 5'-AATTAATT-3' liegt.

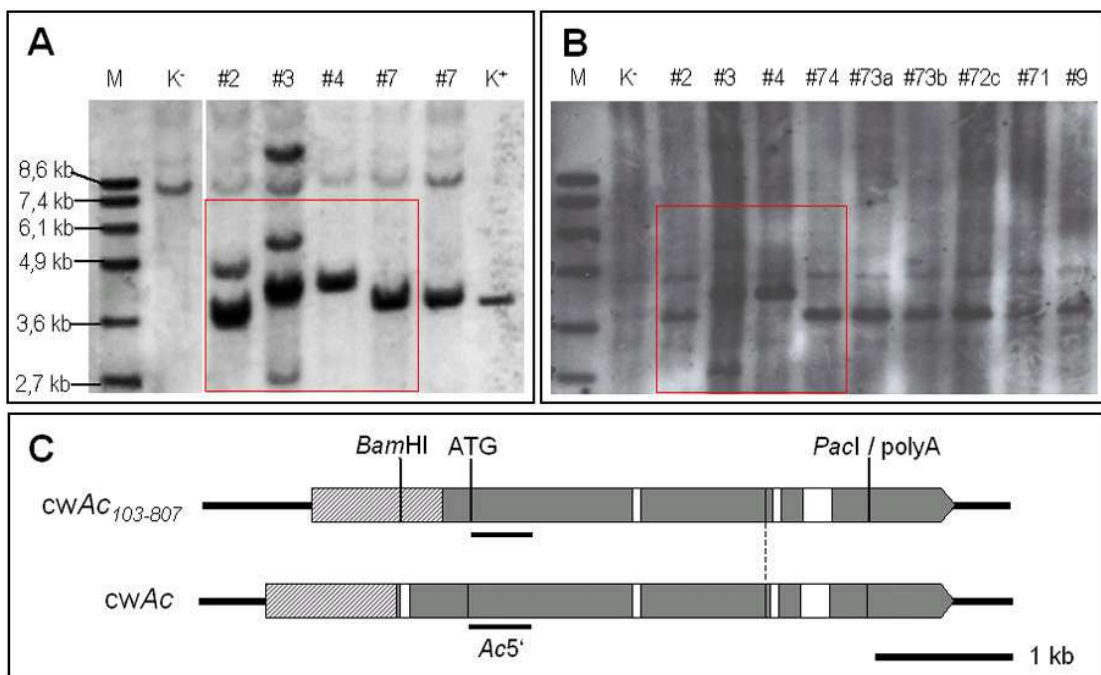


Abbildung 10: Restriktion der *Ac*- Genorte mit *Pac*I und *Bam*HI

Restriktion von je 20 µg genomischer DNA der Gerstenlinien mit *Pac*I und *Bam*HI:

A) Mikrosporenmutterpflanzen: DIG-Marker VII 0,3 µg (Spur M). ‚Golden Promise‘ (Spur K⁻), *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇MS#2/5/1 (Spur 2), *cwAc*MS#3/4/16 (Spur 3), *cwAc*MS#4/18/17 (Spur 4), *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇MS#7/3/5 (Spur 7, links), *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇MS#7/3/10 (Spur 7, rechts), *cwAc*MS#3/4/16 (Spur 3), 8 pg pJAc mit *Pac*I und *Bam*HI restringiert (Spur K⁺). Hybridisierung mit Sonde *Ac*5' (2.3).

B) Regenerate: DIG-Marker VII 0,3 µg (Spur M). ‚Golden Promise‘ (Spur K⁻), DH*cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#2/W2 (Spur 2), *cwAc*#3/R1 (Spur 3), DH*cwAc*#4/U1 (Spur 4), *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#74/u5 (Spur 74), *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a/Z3 (Spur 73a), *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72c/Z1 (Spur 72c), *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#71/O3 (Spur 71), DH*cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#91/p7 (Spur 9). Sonde *Ac*5' (2.3).

C) Schematische Darstellung der *Ac* und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Elemente. Der Balken stellt das jeweilige Konstrukt dar. Der *Ac*-Promotor wird durch eine schraffierte Box dargestellt. Weiße Boxen symbolisieren Introns. Der unterstrichene Bereich deutet die Bindung der Sonde *Ac*5' (2.3) an. Der schwarze Balken stellt eine Länge von 1 kb dar.

Die genomische DNA der Mikrosporenmutterpflanzen sowie der Regenerate ist unter optimalen Bedingungen nacheinander mit *PacI* und *BamHI* restringiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und per Southern-Blot analysiert worden (2.19).

Auch hierbei weisen die Primärregenerate dasselbe Muster wie die Mikrosporenmutterpflanzen auf (Abbildung 10A und B).

Für die Mikrosporenmutterpflanzen und die Regenerate der Linien DHcWAc₁₀₃₋₈₀₇#2, cwAc#3, DHcWAc#4, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#71, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72a, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72c, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73b, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#74 und DHcWAc₁₀₃₋₈₀₇#9 ist pro Linie mindestens eine vollständige Integration des *Ac*- oder *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Elements festgestellt worden (Abbildung 10).

Die Regenerate der Linien DHcWAc₁₀₃₋₈₀₇#2, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 und DHcWAc₁₀₃₋₈₀₇#9 beinhalten jeweils das theoretisch intakte 3,7 kb-Fragment und die der Linien cwAc#3 und DHcWAc#4 die 4,1-kb-Bande, also ebenfalls mindestens ein intaktes *Ac*-Genfragment.

Bei Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2 sind in der Generation der Mikrosporenmutterpflanzen zwei cwAc₁₀₃₋₈₀₇-Fragmente detektierbar, davon eines mit einer Größe von ca. 4,5 kb statt 3,7 kb. Da bei den Regeneraten der Linie DHcWAc₁₀₃₋₈₀₇#2 nur noch eine Bande der Größe des intakten Fragments auftritt (Abbildung 10A und B), ist möglicherweise das umarrangierte Fragment durch Segregation aus dem Genom der Linie verloren gegangen.

In den Linien DHcWAc#4 und cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7, die zwei oder mehr Fragmente enthalten (3.2.1), sind alle Kopien wahrscheinlich intakt (3.2.2). Linie cwAc#3 enthält mindestens vier Fragmente, von denen drei nicht die geeignete Größe haben. Eines ist mit einer Länge von ca. 3 kb zu klein, zwei sind mit 5,5 kb bzw. hochmolekularer Sequenz zu groß. Die verkürzten Fragmente sind möglicherweise auf Fragmente mit internen Deletionen zurückzuführen, die längeren auf unvollständig integrierte Fragmente, deren nächste *BamHI*- oder *PacI*-Restriktionsstellen also im Gerstengenom liegen.

Zusammengefasst ergibt die Southern-Blot-Analyse für die Linien DHcWAc₁₀₃₋₈₀₇#2, DHcWAc#4, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 und DHcWAc₁₀₃₋₈₀₇#9 nur intakte *Ac*-Elementkopien im Gerstengenom. Die Linie cwAc#3 enthält mindestens eine intakte Kopie und zusätzlich noch drei weitere Fragmente.

3.2.4 Analyse der Ac-Transgenweitergabe in Gerstenlinien

Drei der sechs erfolgreich aus Mikrosporen vermehrten Gerstenlinien weisen in Nachkommengenerationen Individuen auf, denen das *Ac*-Element entweder ganz fehlt, etwa bei den Linien *cwAc#3* und *UbiAc* (3.1.3), oder Individuen, die einzelne Genkopien unabhängig voneinander vererben, wie Linie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7*. Bei erfolgreicher Aufdopplung des haploiden Chromosomensatzes während der Kultur von Mikrosporen sollte in den regenerierten Linien keine Segregation stattfinden, da beide Chromosomensätze identisch sind.

Von den per PCR positiv auf *Ac* getesteten Pflanzen (2.15) sind einige per Southern-Blot analysiert worden (3.2.1, 3.2.2, Tabelle 14). Bei allen bisher durchgeführten Southern-Blot-Analysen treten bei der Linie *cwAc#3* die intakten *Ac*-Elementkopien und mehrere unvollständige Elementfragmente bzw. bei Linie *UbiAc* die drei intakten Kopien des *Ac*-Elements gemeinsam auf, so dass diese wahrscheinlich gekoppelt an die Nachkommen weitergegeben werden.

Die Linie *UbiAc* hat in der Regenerate-Generation 80% Individuen mit der *UbiAc*-Integration und in der ersten Nachkommen-Generation noch ca. 60% (3.1.3).

Die ‚*Golden Promise*‘-Linie *cwAc#3* weist zusätzlich zu einer geringen Regenerationseffizienz bei der Mikrosporenkultur (3.1.1) mit nur 21% auffällig wenige regenerierte Pflanzen mit dem *Ac*-Element auf (3.1.1, 3.1.3, Tabelle 8, 3.2.1).

Mittels PCR und Southern-Blot kann festgestellt werden, dass bei den aus Mikrosporen regenerierten Pflanzen der Linie *cwAc#3* eine Segregation des *Ac*-Transgens stattfindet (3.1.3, 3.2.1, 3.2.2). Hinzu kommt eine geringe Fertilität der regenerierten Pflanzen und der durch Selbstung erhaltenen Nachkommenpflanzen: Etwa die Hälfte der Blüten jeder Ähre entwickelt sich nicht weiter zu Körnern (Abbildung 3). Im Gewächshaus kann an Linie *cwAc#3* ein wesentlich langsames Wachstum als an gleichzeitig und unter gleichen Bedingungen kultivierten Gerstenpflanzen anderer *cwAc*-Linien beobachtet werden (Abbildung 3).

Die mangelnde Fertilität und geringe *Ac*-Frequenz führen zu der Hypothese, dass Linie *cwAc#3* nicht in einen homozygot transgenen Zustand gebracht werden kann, da die Integrate an einem Genort liegen, dessen doppelter Verlust für die Pflanze letal wäre. Da die Entwicklung des Korns betroffen ist, wie das Leerbleiben der Blüten zeigt, scheint eine

homozygot letale ‚Knockout‘-Mutante in einem für die Embryonal- oder Endospermentwicklung essentiellen Gen vorzuliegen.

Der *Ac*-Genort wird an 57% der Nachkommen vererbt. Theoretisch tritt bei einem homozygot letalen Erbgang genau das Verhältnis von jeweils einer nicht-transgenen zu zwei heterozygot transgenen zu einer homozygot letalen Pflanze auf. Es sind bisher weniger Transgene aufgetreten; demnach dürfte auch nur etwa ein Viertel der Körner einer Ähre verkümmern statt, wie beobachtet, etwa die Hälfte.

Unter den getesteten Nachkommen der ersten und zweiten Folgegenerationen der Linie *cwAc#3*, die nur aus Elternpflanzen mit nachweisbaren *Ac*-Elementen gewonnen worden sind, enthält jeweils nur etwa die Hälfte das *Ac*-Transposasegen (3.2). Bei der Vererbung eines Genortes, der sich nicht auf die Vitalität der Pflanze auswirkt, kann dieser in 75% der Nachkommen nachgewiesen werden. Bei einem Drittel dieser Pflanzen wäre der Genort homozygot im Genom vertreten (Tabelle 15). Ein Genort, der sich homozygot letal auswirkt, wäre in 66% der Pflanzen nachweisbar und immer heterozygot (Tabelle 15). Ein Drittel der Pflanzen würde kein Transgen enthalten.

Stellt dagegen schon das Vorhandensein eines Allels in entweder den weiblichen oder männlichen Gameten einen Nachteil für die Zellentwicklung dar, wäre der Genort nur in 50% der Nachkommen nachweisbar (Tabelle 15). Dies ist bei Linie *cwAc#3* wahrscheinlich der Fall. Außerdem ist die Entwicklung des Korns bei ca. der Hälfte der Blüten pro Ähre gestört, obwohl die Vitalität der Mikrosporen dieser Linie normal ist (3.1.1), was darauf schließen lässt, dass das durch die Integration des *Ac*-Elements zerstörte Allel für die Entwicklung der weiblichen Gameten oder des Eiapparats, nicht jedoch der männlichen Gameten relevant ist.

Tabelle 15: Möglicher Einfluss des Gametotyps auf die Entwicklung von Zygoten

	kein Einfluss		homozygot letal		letal für Gameten	
	(♀) (♂)	(♀) (♂)	(♀) (♂)	(♀) (♂)	(♀) (♂)	(♀) (♂)
Genotypen	(+) (+)	(+) (-)	(+) (+)	(+) (-)	(+) (+)	(+) (-)
	(-) (+)	(-) (-)	(-) (+)	(-) (-)	(-) (+)	(-) (-)
Nachweisbarkeit	75% (+)		66% (+)		50% (+)	
	25% (-)		33% (-)		50% (-)	

Jeweils links die mütterlichen und rechts die väterlichen Gameten. Dunkelgrau unterlegt sind die Genotypen, die für einen Abbruch der Entwicklung verantwortlich sind. Hellgrau unterlegt sind die Genotypen, die sich entweder bei der Bildung der weiblichen oder der männlichen Gameten letal auswirken können.

Insgesamt ist daher wahrscheinlich, dass bei der Linie cwAc#3 die Vererbung zwar nach Mendel stattfindet, aber keine homozygoten Individuen auftreten können, da *Ac* in ein für die Eizellentwicklung bei Gerste essentielles Gen integriert worden ist.

Die Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 weist nach der Mikrosporenkultur sechs unterschiedliche Sublinien auf, die sich durch die Verteilung von vier spezifisch hybridisierenden *Bam*HI-Restriktionsfragmenten voneinander unterscheiden lassen (Abschnitt 3.2.1, Abbildung 9, Tabellen 11 und 14).

Es sind insgesamt 66 Regenerate, 48 Pflanzen aus der ersten und 26 aus der zweiten Nachkommengeneration der Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 bzw. ihrer Sublinien cwAc₁₀₃₋₈₀₇#71, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72a, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72c, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73b und cwAc₁₀₃₋₈₀₇#74 nach Restriktion mit dem Enzym *Bam*HI per Southern-Blot untersucht worden (Abschnitt 3.2.1).

Unter den regenerierten Nachkommen der Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 ist für jede der Sublinien cwAc₁₀₃₋₈₀₇#71, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72a, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72c, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73b und cwAc₁₀₃₋₈₀₇#74 ein Individuum als Ausgangspflanze ausgesucht worden. Die zweite Ziffer der Liniennummer gibt die Anzahl per *Bam*HI-Southern-Blot-Analyse detektierbaren *Ac*-Fragmente an. Die Buchstaben a bis c im Liniennamen dienen der Unterscheidung von Linien mit einer gleichen Anzahl von Banden (Abbildung 11). Den Restriktionsfragmenten der einzelnen Genorte werden nach abnehmender Fragmentgröße die Buchstaben A bis D zugeordnet (Abbildung 9).

Würden die vier Restriktionsfragmente unabhängig von einander vererbt, gäbe es theoretisch 15 unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten dieser Fragmente. Es sind jedoch bisher nur sechs beobachtet worden, davon zwei ausschließlich in jeweils einer einzigen Pflanze (Abbildung 11).

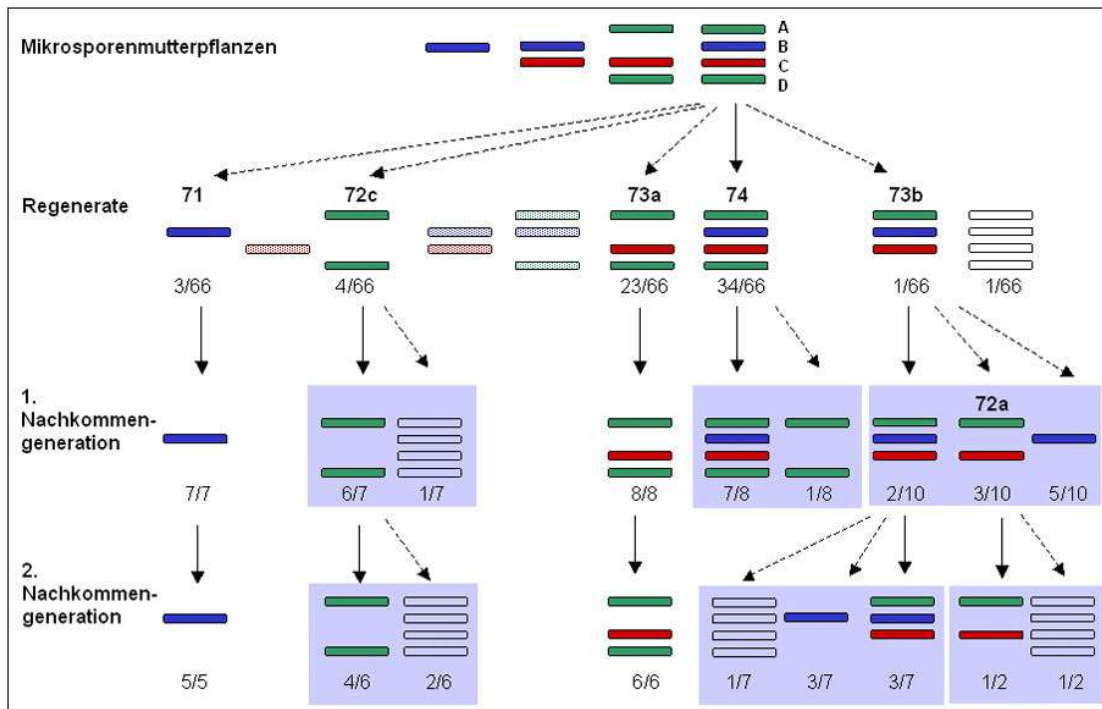


Abbildung 11: Schema der Vererbung der *Bam*HI-Fragmente in den Sublinien von *cwAC*₁₀₃₋₈₀₇#7

Bei der Restriktion von genomischer Gersten-DNA der Mikrosporenmutterpflanzen, der Regenerate und deren Nachkommengeneration mit *Bam*HI in der Linie *cwAC*₁₀₃₋₈₀₇#7 theoretisch mögliche (punktirt) und tatsächlich auftretende (flächig gefärbt) Bandenmuster. Leere Bandenmuster symbolisieren die Abwesenheit nachweisbarer *cwAC*₁₀₃₋₈₀₇-Elemente. Unter den Bandenmustern sind die jeweiligen Häufigkeiten angegeben. Die Banden der einzelnen *cwAC*₁₀₃₋₈₀₇-Integrationen sind nach abnehmendem Molekulargewicht A bis D benannt.

In den Restriktionsmustern der Regenerate treten die Bandenkombinationen 74, 73a, 73b, 72a, 72c und 71 auf (Abbildung 11). Das Restriktionsmuster 73b tritt nur in einem der 66 untersuchten Regenerate der Linie *cwAC*₁₀₃₋₈₀₇#7 und das Bandenmuster 72a erst in der ersten Nachkommengeneration und nur in Nachkommen der einzelnen Pflanze mit dem Muster 73b auf. Die Pflanze der ersten Nachkommengeneration mit dem Muster 72a ist als Ausgangspflanze für die Sublinie *cwAC*₁₀₃₋₈₀₇#72a verwendet worden.

Die Nachkommen der als Ursprungspflanzen ausgewählten Regenerate für die Linien *cwAC*₁₀₃₋₈₀₇#71 und *cwAC*₁₀₃₋₈₀₇#73a segregieren das *Ac*-Element nicht, was darauf hinweist, dass die für die Vermehrung dieser Sublinien ausgewählten Regenerate homozygot sind.

Aus der Häufigkeit, mit der bestimmte Genorte bzw. in diesem Fall Restriktionsfragmente gemeinsam in einer Pflanze auftreten, kann bei Kopplungsanalysen deren genetische Entfernung angegeben werden. Es handelt sich bei den hier beschriebenen Versuchen nicht um eine klassische Kopplungsanalyse, da keine Kreuzung mit einer doppelrezessiven

Elternpflanze durchgeführt worden ist. Die bei der Southern-Blot-Analyse nach der Aufdopplung des Gerstengenoms während der Regeneration gewonnenen Bandenmuster ergeben die gleiche Information über die bei der Gametenbildung stattfindende Segregation wie die Kreuzung mit einer doppelrezessiven Pflanze. Die Häufigkeiten der auftretenden Restriktionsmuster (Abbildung 11, Tabelle 16) in den Regeneraten machen deutlich, welche Genorte unabhängig voneinander und welche gekoppelt vererbt werden (Abbildung 11). Die Nachkommengenerationen sind durch Selbstung gewonnen worden und können daher nicht für Kopplungsanalysen verwendet werden.

Tabelle 16: Vorkommen von *Ac*-Fragmentkombinationen in Gerstenregeneraten

Muster	<i>Ac</i> -Fragmente	Banden	Pflanzen	Prozent
---	0	-	1	1,5
71	1	B	3	4,5
72c	2	A, D	4	6,0
73a	3	A, C, D	23	34,5
73b	3	A, B, C	1	1,5
74	4	A, B, C, D	34	51,5

Anhand der Häufigkeit der einzelnen Bandenmuster kann berechnet werden, wie oft bestimmte Banden gemeinsam vorkommen und wie oft Banden gemeinsam in den Restriktionsmustern fehlen (Tabelle 17).

Tabelle 17: Vorkommen von *Ac*-Fragmentpaaren in regenerierten Gerstenlinien

Fragmente	Gemeinsames	Gemeinsames	Kopplung in %
	Vorkommen in %	Fehlen in %	
A und B	53,0	1,5	54,5
A und C	87,9	6,1	94,0
A und D	92,4	6,1	98,5
B und C	53,0	7,6	60,6
B und D	-	-	-
C und D	86,4	6,1	92,5

Die Summe des gemeinsamen Vorkommens und des gemeinsamen Fehlens von Genorten ergibt deren Kopplungswahrscheinlichkeit in Prozent. Der genetische Abstand zweier Genorte

kann durch Subtraktion der tatsächlichen Kopplungswahrscheinlichkeit von 100% auch in Centimorgan (cM) dargestellt werden (Abbildung 12).

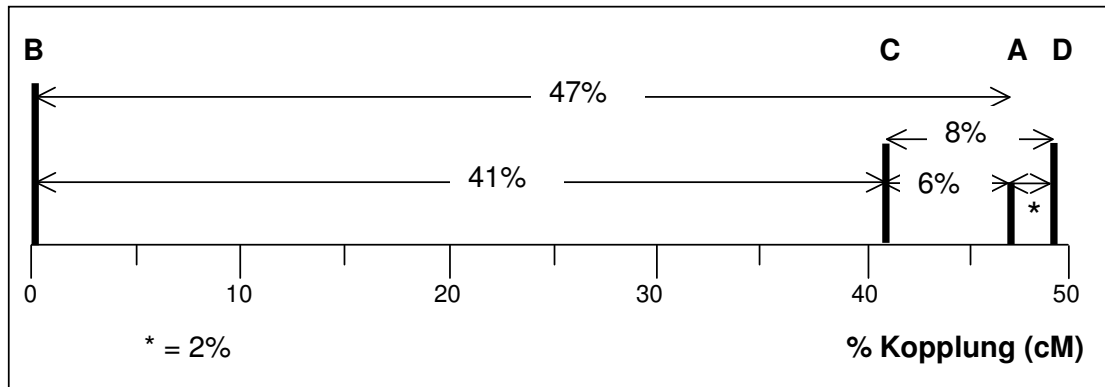


Abbildung 12: Kopplung der Ac-Genorte in den Sublinien von cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7

Anordnung der Ac-Genorte nach deren genetischem Abstand in cM.

Der Genort B liegt von den Genorten A, C und D so weit entfernt (Abbildung 12), dass die Genorte mit hoher Wahrscheinlichkeit unabhängig von einander vererbt werden können. Die Fragmente B und A bzw. B und D sind also kaum gekoppelt. A, C und D scheinen sehr eng gekoppelt zu sein. Da die Restriktionsmuster 73b und 72c nur sehr selten auftreten, könnte es sein, dass Genort A und Genort D gekoppelt vererbt werden. Ihr genetischer Abstand beträgt 1,5 cM (Abbildung 12). Strenggenommen gelten Genorte jedoch erst bei einem genetischen Abstand von unter 0,1 cM als gekoppelt.

Weitere Information liefert eine Analyse der Kreuzungen nach der mendelschen Aufspaltungsregel. Hierzu kann zur Überprüfung der Anzahl unabhängiger Genorte hypothetisch von zwei, drei oder vier unabhängigen Genorten ausgegangen werden. Die beobachteten Zahlen stützen die Hypothese, dass es sich bei Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 um drei voneinander unabhängige Genorte handelt. Bei drei Genorten A, B und C, wobei Genort A außerdem noch an D gekoppelt ist und deshalb als ein einziger Genort behandelt wird, würden sich für die Pflanzen in den meisten Fällen acht mögliche Gameten ergeben: ABC, aBC, AbC, ABc, Abc, aBc, abC und abc, wobei Minuskeln jeweils die Abwesenheit des Ac-Elements am entsprechenden Genort ausdrücken. Bei der Bestäubung käme es zu 64 unterschiedlichen Kombinationen, von denen jedoch wiederum nur acht in einer Southern-Blot-Analyse voneinander unterscheidbar wären. Lässt man Rekombinationsereignisse außer Acht, würden die Kombinationen mit den in Tabelle 18 aufgezeigten jeweiligen Frequenzen auftreten.

Somit wären fast alle theoretisch möglichen Bandenmuster auch tatsächlich aufgetreten. Das hypothetische Muster 73c tritt nicht auf. Muster 72d tritt nur in der Mikrosporengeneration auf und 73a dafür etwa doppelt so oft wie theoretisch zu erwarten.

Tabelle 18: Mendelsche Vererbung von *Ac*-Fragmentkombinationen in Gerstenlinien

Fragm.¹	Mögl. Komb.²	Theoret. Freq.³	Beob. Freq.⁴	Beob. Komb.⁵
3	1	27/64 = 42,2%	44,2%	1 (74)
2	3	27/64 = 42,2% (je 9/64 = 14,1%)	30%	1 (73a)
1	3	9/64 = 14,1% (je 3/64 = 4,7%)	5,2% 4,0%	2 (72c, 71)
0	1	1/64 = 1,6%	1,3%	1 (0)

¹Anzahl ungekoppelter Fragmente

²Anzahl möglicher Fragmentkombinationen

³Theoretisch wahrscheinliche Frequenz für das Vorkommen einer bestimmten Fragmentkombination

⁴Beobachtete Häufigkeit bestimmter Fragmentkombinationen

⁵Anzahl und Art der beobachteten Fragmentkombinationen

Die in den Sublinien der Linie *cwAC₁₀₃₋₈₀₇#7* auftretende Segregation von *Ac*-Elementen kann in Anlehnung an Kopplungsanalysen oder mit einer mendelschen Vererbungsanalyse als die Segregation von drei unabhängigen Genorten interpretiert werden.

Die Wahrscheinlichkeit, dass in einer der regenerierten Pflanzen alle drei Genorte homozygot vorliegen, beträgt 1/64 aller Regenerate bzw. 1/27 aller Regenerate mit dem entsprechenden Bandenmuster in Southern-Blot-Analysen. Es sind nicht nur homozygote Individuen als Ausgangspflanzen für die Linien ausgewählt worden. Das Testen weiterer Pflanzen kann bei diesen beiden Linien jedoch zum Auffinden homozygoter Pflanzen führen.

3.3 Untersuchung von Ac-Transposasetranskripten in Gerste

Ziel der nachfolgend dargestellten Experimente ist die Detektion und Analyse der Transkripte des Ac-Elements in Gerste. Aus dem heterologen System *Arabidopsis thaliana* (Jarvis *et al.* 1997, Martin *et al.* 1997) sind Spleißvarianten für das Ac-Transkript bekannt. Über das Vorkommen und die Varianten des Ac-Transkripts in Gerste sind bisher keine Erkenntnisse publiziert.

Um die Transkripte des Ac-Elements in Gerste zu detektieren, ist eine nicht-radioaktive DIG-Northern-Blot-Analyse optimiert und für die Gerstenlinien DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#2, cwAc#3, DHcwAc#4, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a und *UbiAc* sowie die Maislinien *PI-vv::Ac* und *A188* durchgeführt worden (ohne Abbildung). Jeweils 2 µg mRNA (2.12) sind in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (2.20) und anschließend auf eine Nylonmembran (2.22) transferiert worden. Die Hybridisierung (2.23) der Membran ist mit 100 ng/ml DIG-markiertem *in vitro*-Transkript der Ac-Transposase-cDNA (2.3) bei 70°C erfolgt.

Detektierbar sind eine ca. 2 kb große mRNA-Bande und ein diffuses Signal bei ca. 1 kb in Linie DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#2 und *UbiAc* (ohne Abbildung). Die vollständigen Transkripte haben bei Ac eine Größe von 2,2 kb (2195 bp) bei Ac₁₀₃₋₈₀₇ von 2,1 kb (2115 bp). Das diffuse Hybridisierungssignal bei niedrigen Molekulargewichten in den Linien Ac₁₀₃₋₈₀₇#2 und *UbiAc* deutet auf eine Vielzahl verkürzter Transkripte hin. Möglicherweise sind dort auch degradierte Ac-Transkripte enthalten. In der Maislinie *A188* ist im gleichen Versuch (ohne Abbildung) kein Ac-Transkript nachgewiesen worden.

Trotz bereits durchgeführter Sensitivitätssteigerung sind bei den Northern-Blot-Analysen noch weitere Optimierungen notwendig, da in der ‚Dotblot‘-Kontrolle (2.22) nur eine Detektionsgrenze von 1 pg erreicht wird, in Vorversuchen jedoch bereits 0,5 pg Ac₁₀₃₋₈₀₇-*in vitro*-Transkript in Gersten-RNA erfolgreich detektiert werden konnten (2.22). Unter anderem müsste die eingesetzte RNA-Menge auf 3 µg mRNA erhöht werden, wie bereits für die Detektion von Ac-Transkripten in Mais (*Zea mays* L.) beschrieben (Kunze *et al.* 1987).

Um die Ac-Transkripte in Gerste und Mais weiter untersuchen zu können, sind diese mit der sensitiveren Methode der *Reverse Transkriptase* (RT)-PCR isoliert und anschließend sequenziert worden, wie im Folgenden beschrieben.

3.3.1 Amplifikation von *Ac*- und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Transposasetranskripten aus Gersten- und Maislinien per RT-PCR

Da das *Ac*-Transposasetranskript nur etwa einmal pro Zelle vorkommt (Schein *et al.* 1990) und daher für die Northern-Blot-Analysen mehrere µg mRNA eingesetzt werden müssen, sind weitere Analysen mittels *Reverse Transkriptase* (RT)-PCR durchgeführt worden. Mit der RT-PCR-Methode können schon wenige pg mRNA nachgewiesen werden. Außerdem kann, basierend auf der Amplifikation von cDNA, Sequenzinformation über die unterschiedlichen *Ac*-Transkripte gewonnen werden.

Es ist aus den homozygoten Gerstenpflanzen DHcw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#21/18, DHcw*Ac*#42/9 und DHcw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#91/2/1, den heterozygoten Pflanzen *UbiAc*/2/20, cw*Ac*#34/12, cw*Ac*#34/42/8, cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#72c/4/4, cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73a/17, cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73a/3/16, cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#74m/7, aus Pflanzen der Kultivare ‚*Golden Promise*‘ und *Igri* sowie aus den Maislinien *A188* und *PI-vv::Ac* mRNA isoliert worden (2.12).

Für die Linien cw*Ac*#3 und cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73a ist die mRNA-Präparationen der Pflanzen cw*Ac*#34/12 und cw*Ac*#34/42/8 bzw. cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73a/17 und cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73a/3/16 vereinigt worden, um ausreichend mRNA zur Verfügung zu stellen, da die Individuen der jeweiligen Linie in Southern-Blot-Analysen (3.2.1, Abbildung 8) die gleiche Anzahl *Ac*-Integrationen im Genom aufweisen.

Aus den Maislinien *A188* und *PI-vv::Ac* isolierte mRNAs liefern den Vergleich zwischen Mais (*Zea mays* L.), dem Ursprungsorganismus von *Ac*, und der heterologen Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Die mRNA von ‚*Golden Promise*‘ und *Igri* ist als Negativkontrolle verwendet worden. Pro Linie sind 100 ng mRNA nach *DNaseI*-Restriktion mittels *reverser Transkriptase H* (2.14) und Oligo(dT)₁₈-Primern (2.2.3) in cDNA transkribiert worden.

Die Menge der amplifizierbaren cDNA-Templates ist durch den Nachweis von Transkripten des konstitutiv exprimierten Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gens (*GAPDH*) abgeschätzt worden. Dafür ist die cDNA unter Einsatz der Primerpaare *HvGAPDH-up* und *HvGAPDH-low* (2.2.3) in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) bzw. *ZmGAPDH-for* und *ZmGAPDH-rev* (2.2.3) in Mais (*Zea mays* L.) amplifiziert worden (2.15). Die Primer sind spezifisch für das Gen der mitochondrialen GAPDH aus Gerstenmitochondrien (McGuire *et al.*, unveröffentlicht, Martin *et al.* 1989) bzw. für das Gen der cytosolischen GAPDH *Gpc1*

aus Mais (Brinkmann *et al.* 1987, Martinez *et al.* 1989). Die theoretische Länge der Amplifikationsprodukte beträgt für das Primerpaar *HvGAPDH-up* und *HvGAPDH-low* im intronlosen *HvGAPDH*-Gen 224 bp und für *ZmGAPDH-for* und *ZmGAPDH-rev* im korrekt gespleißten *Gpc1*-Gen 299 bp.

Es sind 20 PCR-Zyklen durchgeführt worden, so dass sich die PCR-Reaktion unter optimalen Bedingungen noch vor dem Sättigungsbereich befindet. Die Reaktionsprodukte sind gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.19) und mit Hilfe softwaregestützter Analyse (2.6) der mit Ethidiumbromid gefärbten Banden quantifiziert worden (2.20.1). Aus der Menge des PCR-Produkts kann durch Division durch 2^n , wobei n die Zyklenzahl ist, die Templatmenge berechnet werden. Anhand dieser Berechnung ist die cDNA nach einer Testamplifikation auf ca. 50 fg Template verdünnt worden und die PCR wiederholt worden.

In allen cDNA-Proben (Abbildung 13C, jeweils linke Spuren) ist amplifizierbare cDNA vorhanden, und jeweils nur die für das GAPDH-Gen spezifische Bande zu sehen.

Um auszuschließen, dass die mRNA-Proben mit DNA kontaminiert sind, ist zusätzlich eine PCR mit der mRNA ohne vorherige cDNA-Synthese durchgeführt worden (Abbildung 13C, jeweils rechte Spuren). Für die PCR sind jeweils 100 pg mRNA verwendet worden, da dies der Menge entspräche, die nach der reversen Transkription in den für die PCR verwendeten cDNA-Aliquots vorhanden wäre.

Tabelle 19: GAPDH-Amplifikatmengen und daraus berechnete Templatmenge in PCR-Ansätzen

Linie	Amplifikatmenge in ng	Templatmenge in fg
GP	171	163
DHcwAc ₁₀₃₋₈₀₇ #2	230	219
cwAc#3	102	97
DHcwAc#4	233	222
cwAc ₁₀₃₋₈₀₇ #73a	152	145
cwAc ₁₀₃₋₈₀₇ #74m	41	39
<i>UbiAc</i>	296	282
<i>A188</i>	231	220
<i>PI-vv.:Ac</i>	187	178

An der unterschiedlichen Intensität der Banden in der gelelektrophoretischen Auftrennung (Abbildung 13 C) ist erkennbar, dass nach der Testamplifikation und Verdünnung weiterhin abweichende Mengen des cDNA-Templates in den Reaktionsansätzen vorhanden sind (Tabelle 19).

Anschließend sind alle Proben mit *Ac*-spezifischen Primern (2.2.3) amplifiziert worden. Da die GAPDH-Templatmenge (Tabelle 19) nur zwischen 40 und 280 fg pro μl beträgt, ist dabei die PCR-Reaktion auf 30 Zyklen ausgedehnt worden, um auch seltene *Ac*- und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Transkripte zu detektieren. Da dadurch in der PCR-Reaktion möglicherweise eine Sättigung auftritt, ist eine Quantifizierung der *Ac*-Transkriptionsprodukte nicht möglich, sondern lediglich eine annähernde Aussage über stärker und weniger stark vorkommende *Ac*-Transkriptfragmente innerhalb einer mRNA-Probe.

5'- und 3'-Sequenzen des *Ac*- bzw. *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Transposasegens sind mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren *Int1-F* und *Int2-R* sowie *Int2-F* und *Int4-R* (2.15.1) aus cDNA der Linien DHcw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#2, cw*Ac*#3, DHcw*Ac*#4, cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#72c/4/4, cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73a, cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#74m, DHcw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#9, *UbiAc*, *A188* und *PI-vv::Ac* amplifiziert worden.

Mit dem Primerpaar *Int1-F* und *Int2-R* (2.15.1) lassen sich 1076 der 1347 bp, das entspricht 80%, von Exon 2 und 426 bp von Exon 3 im Wildtyp-*Ac*-Element amplifizieren. Entsprechend sind es bei *Ac*₁₀₃₋₈₀₇ 1077 der 1167 bp (etwa 90%) von Exon 1 und 426 von Exon 2 (Tabelle 20, Abbildung 13).

Int2-F und *Int4-R* (2.1.6) ermöglichen die Amplifikation eines Fragments, das von Position 2497 bis 4147 des *Ac*-Elements reicht und im Transkript 70 bp von Exon 2 (entspricht Exon 1 in *Ac*₁₀₃₋₈₀₇), das ganze Exon 3 und Exon 4 (bzw. Exon 2 und Exon 3 in *Ac*₁₀₃₋₈₀₇) sowie 145 bp von Exon 5 (bzw. Exon 4 in *Ac*₁₀₃₋₈₀₇) umfasst (Tabelle 20, Abbildung 13).

Tabelle 20: Amplifizierbare *Ac*-Transkriptfragmente

Primerpaar	Position in <i>Ac</i>	Länge in kb	Strukturmerkmal
<i>Int1-F</i> / <i>Int2-R</i>	1490 – 3061	1,6	ungespleißt
		1,5	gespleißt
<i>Int2-F</i> / <i>Int4-R</i>	2497 – 4147	1,6	ungespleißt
		1,1	gespleißt

Es wird also insgesamt das Spleißen der Introns 2 bis 4 von *Ac*, bzw. der Introns 1 bis 3 bei *Ac*₁₀₃₋₈₀₇ überprüft. Der gesamte translatierte Bereich ist abgedeckt, da im *Ac*-Element das erste Exon nicht translatiert wird (Kunze *et al.* 1987).

Die PCR-Amplifikate (Abbildung 13) sind gelelektrophoretisch aufgetrennt worden.

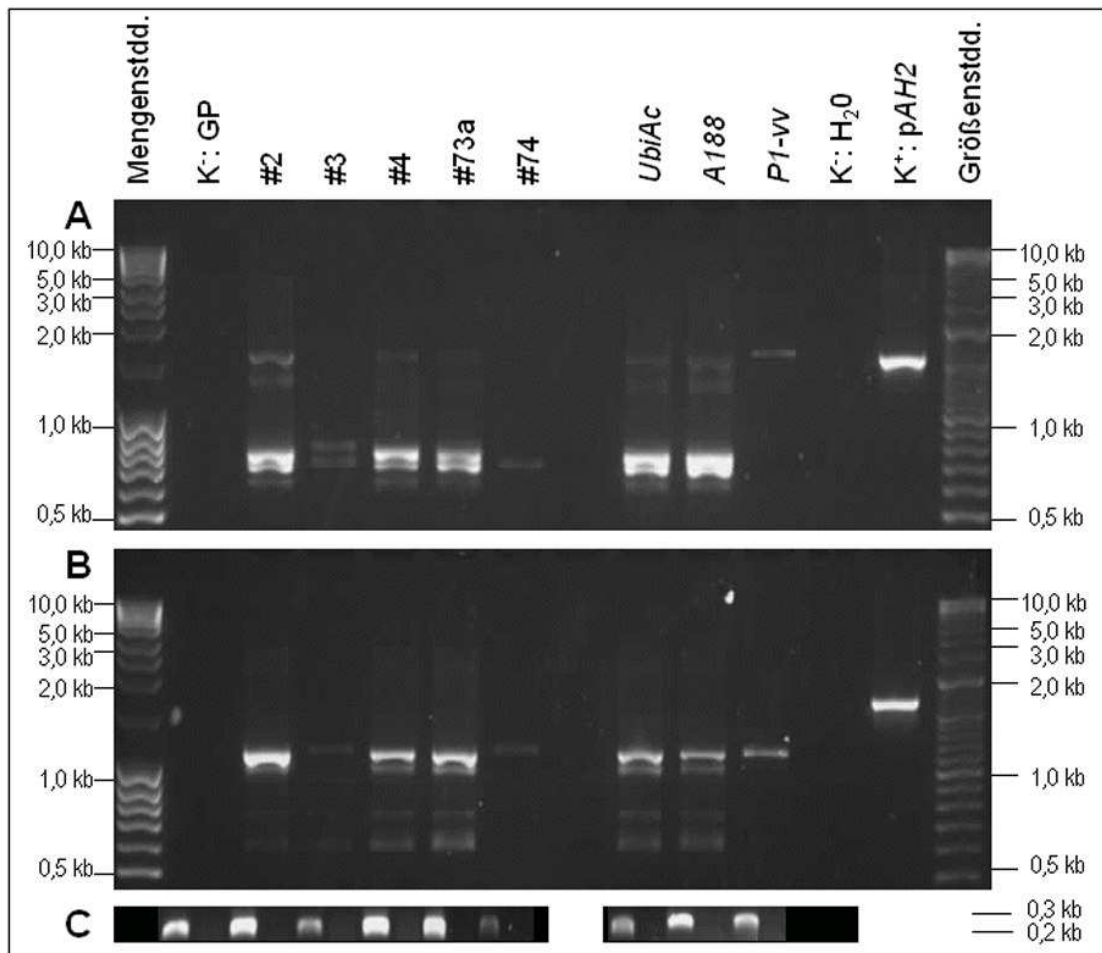


Abbildung 13: RT-PCR-Fragmente der *Ac*-, *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-, *UbiAc*- und Mais-Linien

Gelelektrophoretische Auftrennung einer RT-PCR mit 40-280 fg cDNA von DHcw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#2 (#2), cw*Ac*#3 (#3), DHcw*Ac*#4 (#4), cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#72c (#72c), cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73a (#73a), cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#7m (#7m), DHcw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#9 (#9), *UbiAc*, Maislinie *A188* (*ZmA188*), Maislinie *P1-vv::Ac* (*ZmP1*). 10 ng pAH2 (K⁺: pAH2, 2....). Negativkontrollen ‚Golden Promise‘ (*GP*) und ohne cDNA (K⁻: H₂O). Mengenstandard MassRuler™ 1 µg (2.2.2) und zusätzlicher Größenstandard O’RangeRuler™ 100bp+500bp DNA Ladder (2.2.2).

A) PCR-Ansatz mit je 0,2 µM der Primer *Int1-F* und *Int2-R* (2.2.3).

B) PCR-Ansatz mit je 0,2 µM der Primer *Int2-F* und *Int4-R* (2.2.3).

C) GAPDH-spezifische RT-PCR-Fragmente der *Ac*-, *Ac*₁₀₃₋₈₀₇, *UbiAc* und Mais-Linien nach 20 PCR-Zyklen: Jeweils 40-280 fg cDNA (jeweils linke Spuren) oder 100 pg mRNA (jeweils rechte Spuren). Amplifikation mit 0,2 µM der Primer *HvGAPDH-up* und *HvGAPDH-low* (2.2.3) oder *ZmGAPDH-for* und *ZmGAPDH-rev* (2.2.3).

In allen *Ac*-, *Ac*₁₀₃₋₈₀₇- und *UbiAc*-Gerstenlinien sind amplifizierbare *Ac*-Transkripte vorhanden. Mit den Primern *Int1-F* und *Int2-R* sind am 5'-Ende des *Ac*-Transposasogens fünf Fragmente von jeweils 0,6 kb, 0,69 kb, 0,73 kb, 0,76 kb und 1,5 kb amplifiziert worden (Abbildung 13), wobei die 0,69 und 0,73-kb-Banden die Hauptbanden bilden. Ein Fragment mit einer Größe von 1,5 kb für das korrekt gespleißte Transkript ist vorhanden. Die cDNA der Maislinie *PI-vv::Ac* liefert nur sichtbare Banden für das 1,5 kb lange korrekt gespleißte Fragment.

Für das 3'-Ende des *Ac*-Transkripts (Primer *Int2-F* und *Int4-R*, 2.2.3) sind vier unterschiedliche Fragmente amplifiziert und detektiert worden: 0,6 kb, 0,7 kb, 1,0 kb und 1,1 kb. Hier enthält das hauptsächliche Produkt der RT-PCR (Abbildung 13) von ca. 1,1 kb die Amplifikate des korrekt gespleißten *Ac*-Transkripts. Die cDNA der Linie *cwAc#3* liefert nur die Fragmente von 0,6 kb und 1,1 kb, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#74m und *PI-vv::Ac* nur das Amplifikat des korrekt gespleißten Transkripts von 1,1 kb.

Somit sind bei allen *cwAc*-, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇-, *UbiAc*-Gerstenlinien und bei den Maislinien revers transkribierte und amplifizierte *Ac*-Transposase-cDNA gefunden worden. Alle Linien liefern Amplifikate, die auf korrekt gespleißte Transkripte schließen lassen. Zusätzlich sind bei allen getesteten Gersten- und Maispflanzen kürzere Amplifikate erkennbar.

Das Gerstenkultivar ‚*Golden Promise*‘ enthält keine mit den Primern *Int1-F* und *Int2-R* bzw. *Int2-F* und *Int4-R* amplifizierbaren *Ac*-Sequenzen, so dass die amplifizierten Fragmente weder durch Amplifikation der cDNA eines gersteendogenen Transkripts noch durch Kontamination der Reagenzien entstanden sein können.

3.3.2 Sequenzanalyse der klonierten *Ac*-Transkriptfragmente

Um detaillierte Sequenzinformation für die Spleißprodukte der *Ac*-Transposase-mRNA in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Mais (*Zea mays* L.) innerhalb des amplifizierten 1,5-kb-Fragments am 5'-Ende und des 1,1-kb-Fragments am 3'-Ende zu erhalten und die Identität der kürzeren Amplifikate zu klären (Abbildung 13), sind die PCR-Produkte aus dem Agarosegel isoliert, kloniert und sequenziert worden (2.16). Es sind 22 Klone anhand der Größe der integrierten Fragmente für die Sequenzierung ausgewählt worden (Tabelle 21).

Aufgrund des bei den Linien *DHcwAc*₁₀₃₋₈₀₇#2, *DHcwAc*#4, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a, *UbiAc* und *A188*-Mais auftretenden gleichen Bandenmusters sind Klone der Linie *DHcwAc*₁₀₃₋₈₀₇#4 mit den Amplifikaten von 0,6, 0,68, 0,73 bzw. 0,76 kb für das 5'-Ende des *Ac*-Transposase-Transkripts und 0,6, 0,7, 1,0 bzw. 1,1 kb für das 3'-Ende exemplarisch ausgewählt worden.

Die Sequenzierungen sind mit den Primern *M13-Rev*, *T7QL* und *cwAH2-3* (2.2.3) durchgeführt worden, die im Klonierungsvektor binden; außerdem mit den Primern *cwAH2-4* und *cwAH2-6* (2.2.3), die innerhalb der *Ac*-Transposase-Sequenz (2.4) binden.

Tabelle 21: Sequenzierte Klone und Größen der darin enthaltenen Amplifikate

Bereich	Anzahl Klone	Größe in kb	Herkunftslinien
5'-Ende	3	0,6	<i>HvDHcwAc#4</i> und <i>ZmP1-vv::Ac</i>
	5	0,68	<i>HvDHcwAc#4</i> und <i>HvcwAc₁₀₃₋₈₀₇#74m</i>
	1	0,73	<i>HvDHcwAc#4</i>
	2	0,76	<i>HvDHcwAc#4</i>
	1	1,5	<i>ZmP1-vv::Ac</i>
3'-Ende	3	0,6	<i>HvDHcwAc#4</i>
	1	0,7	<i>HvDHcwAc#4</i>
	1	1,0	<i>HvDHcwAc#4</i>
	5	1,1	<i>HvDHcwAc#4</i> , <i>HvcwAc₁₀₃₋₈₀₇#74m</i> und <i>ZmP1-vv::Ac</i>

Die durch Sequenzierung der Klone erhaltenen Sequenzen sind mit den Sequenzen des *Ac*-Transposase-Konstrukts *pJAc*, des *cwAc₁₀₃₋₈₀₇*-Konstrukts *pAH2* und mit der eines cDNA-Klons aus *Zea mays* *pET13::10ATG* verglichen worden (2.3). Die Sequenzierungsdaten bestätigten für das 1,5-kb-Fragment am 5'-Ende und für das 1,1-kb-Fragment am 3'-Ende das Vorliegen von korrekt gespleißter mRNA.

Die sequenzierten Transkriptfragmente von 1,5 kb im 5'-Bereich und 1,1 kb im 3'-Bereich sind homolog zu Sequenzen der *Ac*-Transposase-cDNA (Kunze *et al.* 1987). In den Sequenzen der kürzeren Fragmente sind die Introns ebenfalls korrekt herausgespleißt.

Die untersuchten Linien weisen zusätzlich zum korrekt gespleißten *Ac*-Transposase-Transkript weitere Transkriptfragmente mit internen Deletionen auf. Es sind vier in Exon 2 und drei in Exon 3 alternativ gespleißte Transposase-Transkripttypen entdeckt worden. Zusätzlich zu den bekannten Introns werden unter Verwendung kryptischer Spleißstellen Sequenzen von entweder 744, 766, 822 oder 899 Basenpaaren in Exon 2 und von 97, 376 oder 512 Basenpaaren in Exon 3 herausgespleißt (Tabelle 21, Abbildung 14).

Bei den mit den Primern *Int1-F* und *Int2-R* amplifizierten Transkriptfragmenten ist Intron 2 korrekt herausgespleißt. Die Sequenzen sind bis zu Position 1581 homolog zur Sequenz des *Ac*-Transposasegens. Mit dem Programm *SplicePredictor* (2.6) ist das *Ac*-Transposasegen auf Spleißstellen untersucht worden, die der Konsensussequenz in monokotylen Pflanzen entsprechen. Bei Position 1581 des *Ac*-Elements befindet sich eine mögliche Donorspleißstelle. Bei allen Deletionsvarianten von Exon 2 wird diese Donorspleißstelle tatsächlich benutzt. Als Akzeptorspleißstellen werden laut Sequenzierungsergebnis die Positionen 2325, 2346, 2403 und 2481 genutzt. Es befindet sich jedoch nur bei Position 2403 eine mit dem *SplicePredictor* (2.5) vorhersagbare Akzeptorspleißstelle. Für die anderen drei Fragmente lässt sich keine der Konsensussequenz entsprechende Akzeptorstelle bestimmen.

In den mit den Primern *Int2-F* und *Int4-R* amplifizierten Transkriptfragmenten ist die Sequenzidentität mit der *Ac*-cDNA (Kunze *et al.* 1987) bei Position 2736 des *Ac*-Elements unterbrochen. Dort befindet sich eine vom *SplicePredictor* (2.5) identifizierte 5'-Donorspleißstelle. Die zusätzlichen Deletionen enden bei den Positionen 2833, 3105 bzw. 3241. Nur für die Klone, in denen die Sequenzidentität bei Position 3241 wiederaufgenommen wird, befindet sich an dieser Stelle eine durch den *SplicePredictor* (2.5) vorhergesagte Akzeptorspleißstelle. Die aus der *Ac*-cDNA (Kunze *et al.* 1987) bekannten Introns 2, 3 und 4 werden unter Verwendung der vorhergesagten Spleißstellen korrekt aus den zugrundeliegenden *Ac*-Transkripten gespleißt.

Abbildung 14 zeigt einen Überblick über alle detektierten Spleißvarianten und Fragmente.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in allen untersuchten Mais- und Gerstenlinien ein korrekt gespleißtes *Ac*-Transposase-Transkript vorhanden ist. Zusätzlich sind in den hier beschriebenen Experimenten verkürzte *Ac*-Transkriptfragmente bei den Gerstenlinien DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#2, cwAc#3, DHcwAc#4, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a, *UbiAc* und der Maislinie A188 detektiert worden (Abbildung 14). Bei diesen Transkriptfragmenten sind durch alternatives Spleißen Exonsequenzen deletiert worden. Es ist kein ungespleißtes Transkript detektiert worden. In der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR mit den Primern *Int1-F* und *Int2-R* sind bei der Maislinie A188 die verkürzten *Ac*-Transkriptfragmente als Banden sichtbar (Abbildung 13), so dass wahrscheinlich auch in Mais (*Zea mays* L.) alternativ gespleißte Transkripte vorhanden sind. Die Maislinie *PI-vv::Ac* liefert nur für das korrekt gespleißte Transkript sichtbare PCR-Banden (Abbildung 13). Das 0,6-kb-Transkriptfragment lässt sich auch in *PI-vv::Ac* detektieren und sequenzieren (Tabelle 21).

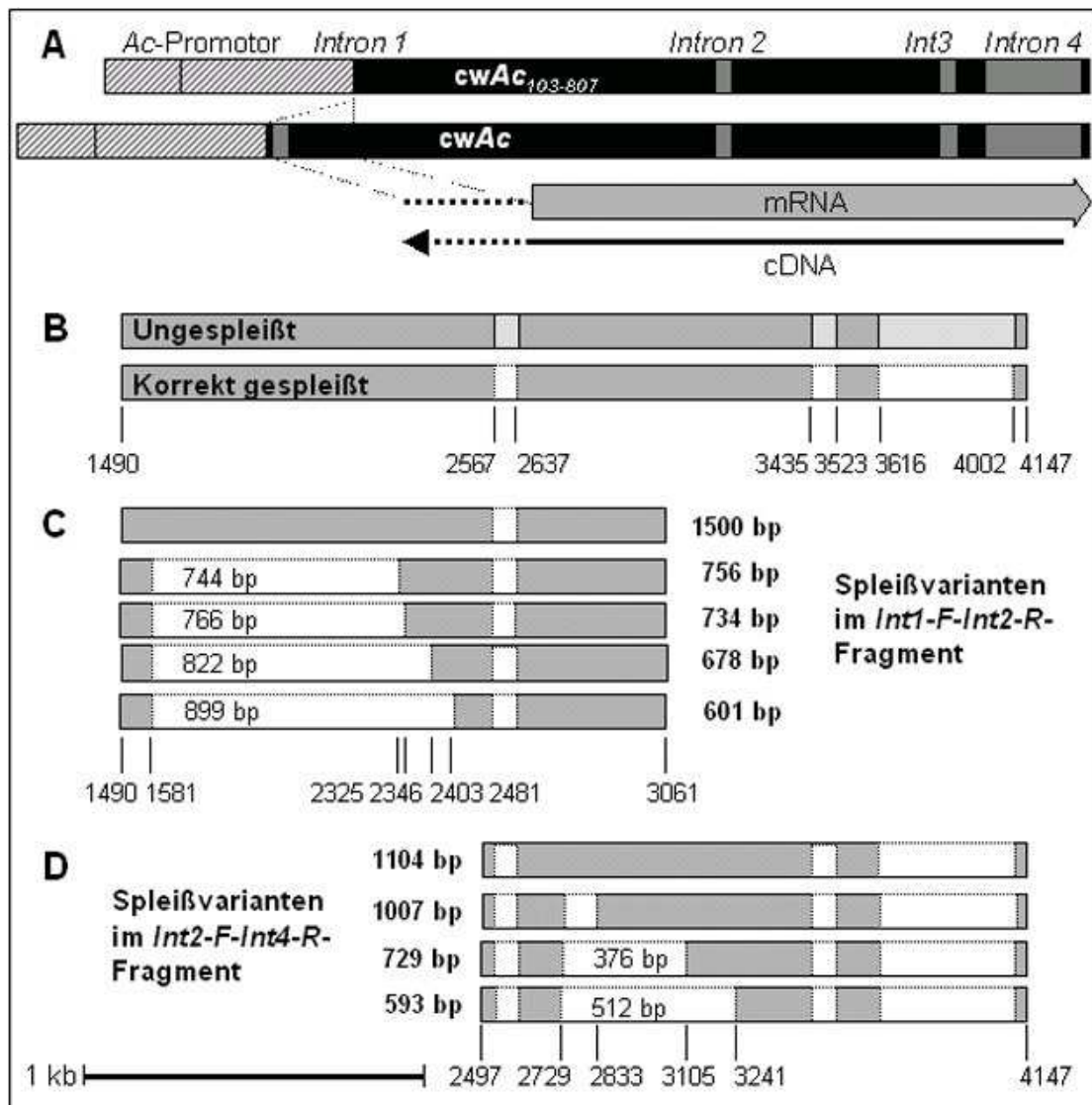


Abbildung 14: Schematische Darstellung der *Ac*-Transposase-Transkripte und PCR-Fragmente der Transposase-cDNA der *cwAc*-, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇- und *UbiAc*-Linien

A) Die schwarzen Balken repräsentieren das *cwAc*- und das *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇-Element jeweils vom Promotor bis zum Polyadenylierungssignal. Hellgraue Boxen symbolisieren die Introns des Transposasegens. Der *Ac*-Promotor ist eng schraffiert. Die Pfeile symbolisieren mRNA und cDNA.

B) Der obere Balken repräsentiert das durch die Primer *Int1-F* bis *Int4-R* amplifizierbare 2657 bp lange cDNA-Fragment, das dem ungespleißten *Ac*-Transposasetranskript entspricht. Hellgraue Boxen stellen die Introns des *Ac*-Transposasegens dar. Weiße Boxen symbolisieren die erfolgreich herausgespleißten Introns. Durch Teilstriche markierte Positionen im amplifizierten PCR-Fragment entsprechen denen im Wildtyp-*Ac*-Element.

C) *Int1-F/Int2-R*-PCR-Fragment der korrekt gespleißten *Ac*-Transposase-mRNA (1,5 kb) und unter Verwendung zusätzlicher Spleißstellen entstandene Deletionsvarianten. Die Balken deuten das aus der *Ac*-cDNA amplifizierte Fragment an. Weiße Boxen markieren die korrekt herausgespleißten Introns und die zusätzlichen Deletionen.

D) *Int2-F/Int4-R*-PCR-Fragment einer korrekt gespleißten *Ac*-Transposase-mRNA (1,1 kb) und dessen Deletionsvarianten.

3.4 Aktivität der *Ac*-Transposase in Gerste

Die Aktivität des Transposaseenzym ist ein wichtiger Aspekt der Expression des *Ac*-Elements in Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Ziel der Versuche ist die Etablierung eines Testsystems für die Aktivität der *Ac*-Transposase in Gerste und ferner der Vergleich der Aktivität unterschiedlicher Gerstenlinien.

Bei der Transposase setzt sich die Aktivität zusammen aus der Fähigkeit, das *Ac*-Element oder *Ds*-Elemente zu exzidieren und der Fähigkeit, die Elemente erneut ins Genom zu integrieren. Die Fähigkeit der *Ac*-Transposase zur Induktion von Transpositionseignissen kann durch die Exzision des nicht-autonomen Elements *mDs* aus einem Reporter-genkonstrukt und dem anschließenden Nachweis der Reporter-genaktivität gemessen werden. Dazu wird das Reporter-genkonstrukt per Partikelbeschuss transient ins Gewebe von *Ac*-Gerstenpflanzen eingebracht (Abbildung 15). Nach erfolgter *mDs*-Exzision aus dem Reporter-genkonstrukt gelangt das Reporter-gen *uidA* unter die Expressionskontrolle eines Promotors und wird exprimiert (Abbildungen 15 und 16).

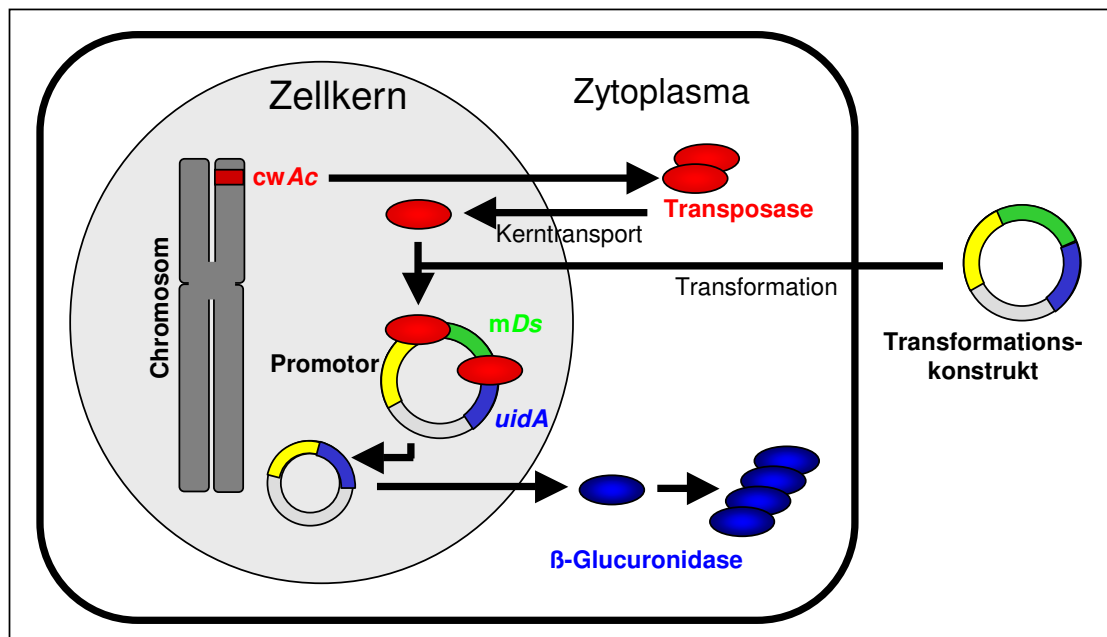


Abbildung 15: Schematische Darstellung der semi-transienten Tests zur indirekten Bestimmung der *Ac*-Transposaseaktivität in Gerste

Dargestellt ist eine Pflanzenzelle mit Zytoplasma und Zellkern. Das *Ac*-Element (rot) im Gerstengenom (ein Chromosom in grau dargestellt) exprimiert *Ac*-Transposase (rote Ovale). Das nicht-autonome Element *mDs* (grün) wird in einem Plasmid in die Zellen eingebracht. Es befindet sich auf dem Plasmid zwischen dem *uidA*-Gen (blau) und einem Promotor (gelb). Das *uidA*-Gen kann β -Glucuronidase (blaue Ovale) exprimieren.

Die Expression des *uidA*-Gens kann dann als β -Glucuronidase-Aktivität histochemisch durch die Umsetzung des Substrats X-Gluc zu einem blauen Farbstoff detektiert werden (2.28). Die histochemische β -Glucuronidase-Färbung markiert somit die Zellen, in denen erfolgreiche *mDs*-Exzisionen stattgefunden haben. Zusätzlich sind bei allen Ansätzen als interner Standard die Konstrukte *cI* und *rI* (2.4) ko-transformiert worden, die zwei Gene des Anthocyanstoffwechsels kodieren.

3.4.1 Optimierung von semi-transienten Tests zur indirekten Messung der *Ac*-Transposase-Aktivität in Gerste

In Vorversuchen (Friedrich 2001) wurde das Reporter-genkonstrukt *pAct/mDs/GUS* (Abbildung 16A, 2.3) verwendet, das den *Actin1*-Promotor aus Reis (*Oryza sativa* L., McElroy *et al.* 1990) enthält. Die mit diesem Reporter-genkonstrukt erhaltenen Messwerte für die Aktivität der *Ac*-Transposase waren alle sehr gering, so dass eine Optimierung der Sensitivität durchgeführt werden musste. Als Gewebe wurde hierfür das Skutellum von *Ac*- und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇-exprimierenden Gerstenpflanzen verwendet.

Mit dem *pAct/mDs/GUS*-Konstrukt sind pro Skutellum bei der indirekten Messung der *Ac*-Transposaseaktivität nur vereinzelt GUS-Signale registriert worden. Diese geringe Signalanzahl wird darauf zurückgeführt, dass sich in diesem Konstrukt hinter dem *Actin1*-Promotor einige Basen des offenen Leserahmens des *Actin1*-Gens befinden, so dass nach der Exzision von *mDs* nur in einem Drittel der Fälle ein durchgehender offener Leserahmen für das *uidA*-Reporter-gen entsteht (Abbildung 16A). Weitere Versuche sind daher mit dem Reporter-genkonstrukt *pUbi::mDs::GUS* (Abbildung 16B) durchgeführt worden, welches den *Ubiquitin1*-Promotor (Christensen *et al.* 1992) enthält, gefolgt von einer nicht-kodierenden Linker-Sequenz aus dem *waxy*-Gen aus Mais (*Zea mays* L.), dann einem *mDs*-Element, das durch Deletion des mittleren *HindIII*-Fragments aus *Ac* gewonnen wurde, sowie dem *uidA*-Gen (Abbildung 16).

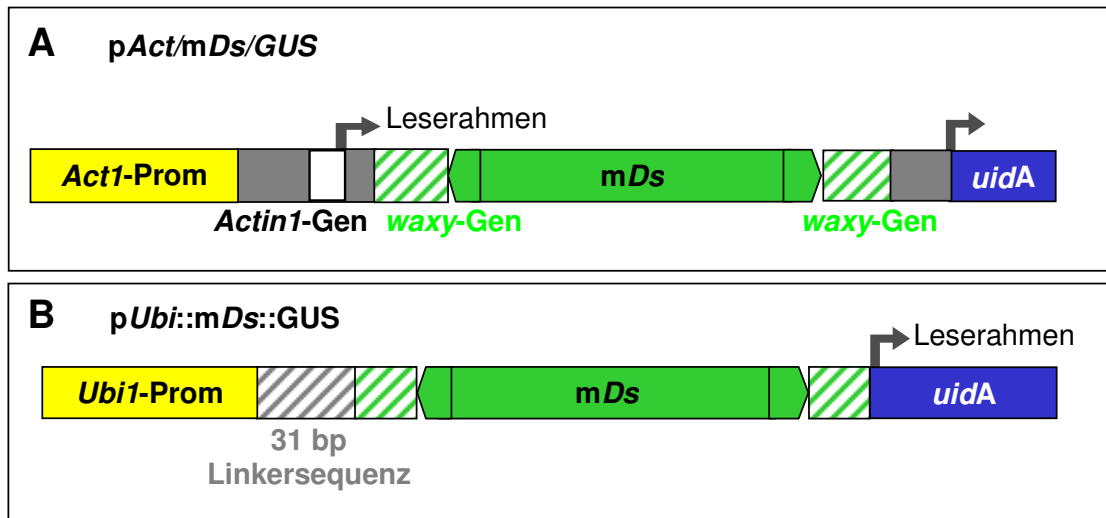


Abbildung 16: Exzisions-Reportergenkonstrukte pUbi::mDs::GUS und pAct/mDs/GUS im Vergleich

In beiden Konstrukten (A und B) gelangt nach Exzision von mDs (grüner Balken) aus der waxy-Sequenz (grün schraffiert) durch Ac-Transposase das uidA-Gen (blau) unter die Kontrolle des Actin1-Promotors (gelber Balken, A) bzw. unter die des Ubiquitin1-Promotors (gelber Balken, B)

A) pAct/mDs/GUS enthält nach dem Actin1-Promotor (gelb) ein Bruchstück des Actin1-Gens (grau) einschließlich des ersten Introns (weiß). Möglicherweise kann es bei der Expression des dahinter liegenden uidA-Gens (blau) zu Verschiebungen des Leserahmens (Pfeile) kommen

B) In pUbi::mDs::GUS ist das uidA-Gen (blau), der erste Leserahmen (Pfeil) nach dem Promotor (gelb) und einem untranslatierten Linker (grau schraffiert).

Zur Herstellung des Plasmids pUbi::mDs::GUS ist das Ac-Element zwischen dem Ubiquitin1-Promotor und dem uidA-Gen in das Plasmid pUbiGUS kloniert worden. Anschließend ist durch Exzision eines HindIII-Fragments das Ac-Element in das mDs-Element umgewandelt worden. Das mDs-Element exprimiert selbst keine funktionelle Transposase.

Für die Versuche zur Messung der Aktivität von Ac in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) sind zur Erhöhung der Sensitivität die Inkubationszeiten, Plasmidmengen und die X-Gluc-Konzentration im Färbepuffer modifiziert worden. Nach Optimierung des Versuchsprotokolls (2.25, 2.26, 2.27) ist wie folgt verfahren worden.

Die Gewebeproben sind drei bis vier Stunden vor der Transformation auf osmotisches PL-Medium umgesetzt worden. Pro Transformationsansatz sind 88 ng Goldpartikel mit 735 ng pAct/mDs/GUS oder pUbi::mDs::GUS beschichtet und transformiert worden. Als interner Standard ist mit den Genen *c1* und *r1* (2.4) des Anthocyanstoffwechsels aus Mais (*Zea mays*

L.) ko-transformiert worden. Die Bildung von Anthocyanfarbstoffen im transformierten Gewebe gibt vor der β -Glucuronidase-Färbung Aufschluss über die Transformationseffizienz und über die Vitalität des transformierten Gewebes. Die Menge der internen Standards *cI*-sense und *rI*-sense (2.4) ist dabei von jeweils 13 ng in Vorversuchen auf 7 ng reduziert worden, was eine Verringerung der Signalanzahl von ca. 200 pro transformiertem Skutellum auf im Mittel ca. 60 zur Folge hat und die numerische Auswertung wesentlich beschleunigt. Die Signale des internen Standards *cI* und *rI* auf den Kalli sind zwei Tage nach Transformation unter sterilen Bedingungen ausgezählt worden.

Bei der Auswertung sind nur die Skutellumproben berücksichtigt worden, die vor der histochemischen β -Glucuronidase-Färbung Anthocyansignale aufwiesen, da bei Proben ohne Anthocyansignale nicht sichergestellt werden kann, dass die Partikeltransformation erfolgreich gewesen ist, und die Transformationseffizienz bestimmt werden kann.

Anschließend ist eine β -Glucuronidase-Färbung der einzelnen Gewebeproben (2.28) mit einer Färbelösung von 1 mg/ml X-Gluc (2.28.1) durchgeführt worden.

Die Vorgehensweise für die semi-transienten Tests im Laufe der Experimente ist insbesondere durch die Verwendung des neuen Transformationskonstrukts *pUbi::mDs::GUS* verändert worden. Daher sind die Gewebeproben für die Auswertung in drei Gruppen, mit jeweils innerhalb der Gruppe einheitlichen Bedingungen, zusammengefasst worden (Abbildungen 17A-C). Die erste Gruppe beinhaltet die Ergebnisse der Transformation mit *pAct/mDs/GUS* (Abbildung 17A), die zweite die Ergebnisse der Transformation mit *pUbi::mDs::GUS* bei histochemischer Detektion 24 Stunden nach der Transformation (Abbildung 17B) und die dritte die Ergebnisse der Transformation mit *pUbi::mDs::GUS* bei histochemischer Detektion 48 Stunden nach der Transformation (Abbildung 17C).

Die sechs Linien *cwAc#3*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72a*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72c*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a*, *DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#9* und *UbiAc* von insgesamt elf getesteten Linien zeigen eine deutliche Steigerung der Messsensitivität mit dem Testkonstrukt *pUbi::mDs::GUS* gegenüber *pAct/mDs/GUS* (Abbildung 18). Bei Linie *cwAc#3* findet mit dem Konstrukt *pUbi::mDs::GUS* eine Steigerung von nicht messbarer Aktivität auf 5,7% statt und bei *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72a* auf 2,6%. Bei *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72c* erhöhte sich die messbare Aktivität von 14,2% auf 16,6%, bei *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a* von 3,4% auf 70,7%, bei *DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#9* von 45,5% auf 125,1% und bei *UbiAc* von 1,2% auf 63,1% (Abbildung 18). Bei den drei Linien *DHcwAc#4*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#71* und *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#74* ist die mit *pUbi::mDs::GUS* messbare Aktivität geringer als die mit *pAct/mDs/GUS* messbare. *DHcwAc#4* weist statt 2,2% nur noch 0,6% Aktivität,

cwAc₁₀₃₋₈₀₇#71 nur 0,8% statt 6,2% und cwAc₁₀₃₋₈₀₇#74 nur 9,2% statt 16,8% auf (Abbildung 18). Die Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73b liefert mit beiden Testkonstrukten die gleichen Aktivitätsmesswerte von etwa 5% (Abbildung 18).

3.4.2 Standardisierung von Gewebeproben für semi-transiente Tests zur indirekten Messung der Ac-Transposase-Aktivität in Gerste

Da es nicht möglich ist, alle Skutellumproben im gleichen Entwicklungsstadium zu ernten, und sogar innerhalb einer Ähre Variationen im Entwicklungsstand des Skutellums auftreten, muss eine geeignete standardisierte Vorgehensweise entwickelt werden, um die Vergleichbarkeit der einzelnen Transformationsexperimente zu gewährleisten.

Die Transformation von ‚Golden Promise‘-Gerste (*Hordeum vulgare* L.) mit den β -Glucuronidase exprimierenden Konstrukten pActinGUS oder pUbiGUS, die kein mDs enthalten, dient bei allen Versuchen als Positivkontrolle für die Detektion der β -Glucuronidase-Aktivität. Die Anthocyan- und β -Glucuronidase-Signale werden anhand der Mittelwerte des Skutellumdurchmessers auf Signale pro Quadratmillimeter Skutellumgewebe umgerechnet. Die Anzahl der Anthocyan- und β -Glucuronidase-Signale pro Quadratmillimeter der Positivkontrollen variiert jedoch im Laufe der Skutellumentwicklung (Abbildung 17A-C). Daher werden die Ergebnisse der Transformation mit pActinGUS oder pUbiGUS auch zur Standardisierung durch die Bestimmung eines Korrekturfaktors herangezogen.

Alle Versuchsgruppen zeigen sowohl bei den Anthocyan signalen als auch bei den β -Glucuronidase-Signalen zwei Maxima (Abbildung 17A-C). Die Position der Aktivitätsmaxima weicht in den unterschiedlichen Versuchsgruppen voneinander ab. Da ein erstes Aktivitätsoptimum der β -Glucuronidase in allen Versuchsgruppen bei einer Skutellumgröße von ca. zwei bis drei Quadratmillimetern liegt, handelt es sich hierbei vermutlich um das hauptsächliche biochemische Aktivitätsoptimum des Skutellumgewebes, so dass die Aktivitäten aller Gewebeproben, die größer oder kleiner als 2 mm² sind, auf die putative Aktivität an diesem Maximum umgerechnet worden sind.

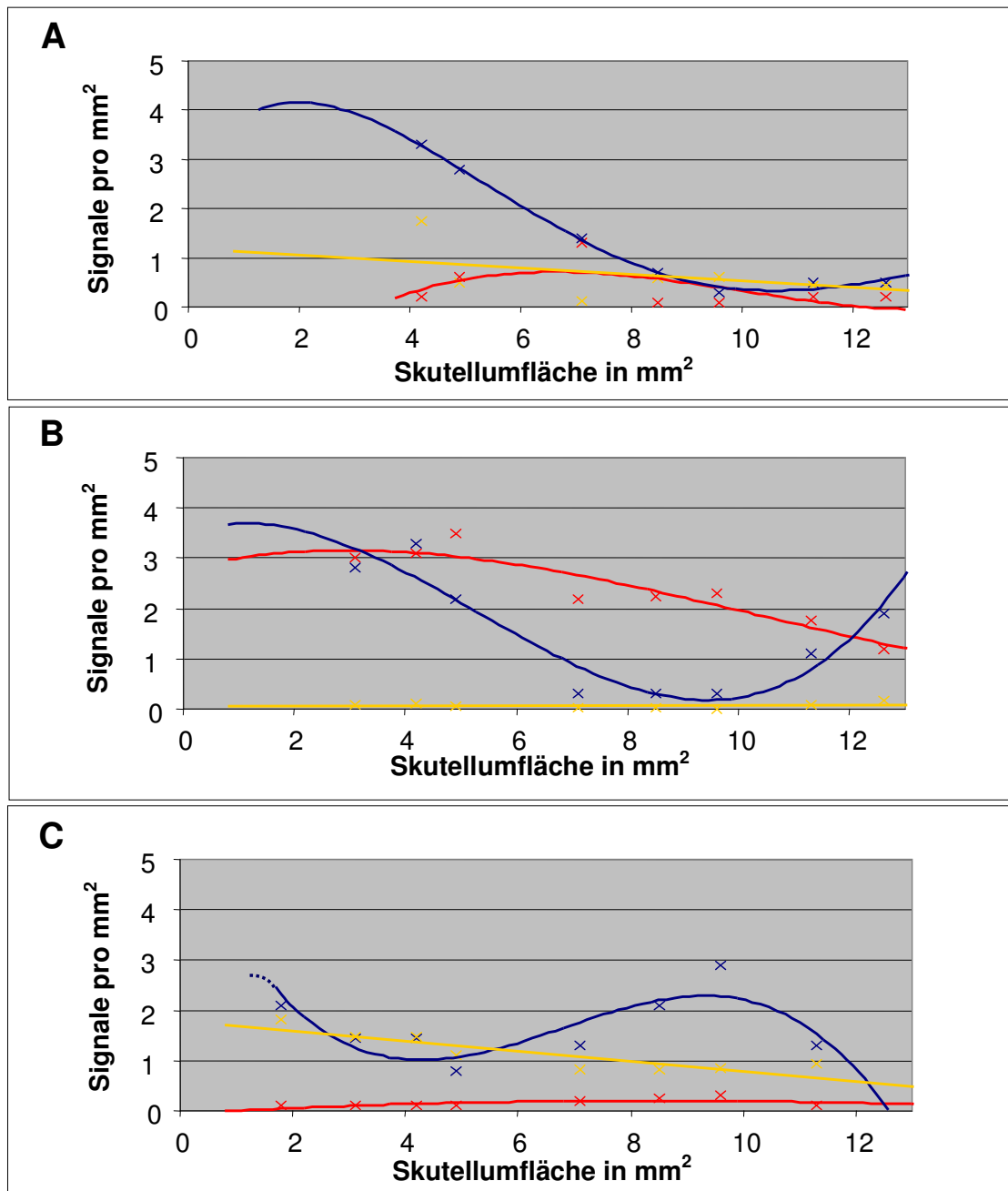


Abbildung 17: Anthocyan-Signale und β -Glucuronidase-Signale der *pActinGUS*- und *pUbiGUS*-Kontrollen in den einzelnen Versuchsgruppen

A, B und C) Darstellung der Veränderung in der Anzahl der Anthocyan-Signale/mm² (dunkelrote Kurven) und β -Glucuronidase-Signale/mm² (blaue Kurven) in Gerstenskutellum in Abhängigkeit von dessen Größe. Das Verhältnis von Anthocyan- zu β -Glucuronidase-Signalen nimmt im Laufe der Skutellumentwicklung annähernd linear ab (gelbe Regressionsgerade). Dargestellt sind die Werte für drei unterschiedliche Versuchsgruppen.

A) Erste Versuchsgruppe unter Verwendung von *pActinGUS* und *pAct/mDs/GUS*.

B) Versuchsgruppe unter Verwendung von *pUbiGUS* und *pUbi::mDs::GUS*, Auswertung nach 24 Stunden.

C) Versuchsgruppe unter Verwendung von *pUbiGUS* und *pUbi::mDs::GUS*, Auswertung nach 48 Stunden.

Die Auswertung der Positivkontrollen *pActinGUS* und *pUbiGUS* (Abbildung 17A-C) zeigt, dass das Verhältnis von β -Glucuronidasesignalen (G) zu Anthocyansignalen (A) ebenfalls mit dem Entwicklungsstand (Alter bzw. Größe) der Gewebeproben variiert. Insgesamt nimmt die Ratio von G/A im Laufe der Skutellumentwicklung annähernd linear ab (Abbildung 17A-C). Daher ist die Einführung eines Korrekturfaktors (K) erforderlich. Der Korrekturfaktor gibt für jede Versuchsgruppe den Wert an, mit dem die Messwerte unter Berücksichtigung des tatsächlichen Skutellumdurchmessers (D) zu multiplizieren sind, um den beim optimalen Skutellumdurchmesser von 2 mm zu erwartenden Aktivitätswert zu erhalten.

$$G \cdot K/A = f(D)$$

Die vereinfachende lineare Regression der G/A-Ratio lässt den G/A-Wert beim Aktivitätsoptimum berechnen. Die Regressionsgeraden haben alle die Form:

$$y = n \cdot x + m$$

Dabei ist n die Steigung der Geraden und m die Verschiebung entlang der y-Achse. Die Variablen x und y lassen sich durch G/A und D ersetzen:

$$G/A = n \cdot D + m$$

Da der Korrekturfaktor K für D = 2 mm gelten soll, ist:

$$G \cdot K/A = 2n + m$$

Daraus ergibt sich für jede Versuchsgruppe ein spezifischer Wert (S) für $G \cdot K/A$, der durch Einsetzen der Werte für n und m ermittelt werden kann:

$$G \cdot K/A = S$$

$$S = 2n + m$$

Durch Umformung von

$$S/K = G/A$$

nach

$$K = S \cdot (G/A)^{-1}$$

und unter Berücksichtigung von

$$S/K = n \cdot D + m$$

ist

$$K = S \cdot (n \cdot D + m)^{-1}$$

oder

$$K = S/n \cdot D + S/m$$

Nach Einsetzen der Werte für m, n und S ergibt sich der Korrekturfaktor für die Versuchsgruppe mit dem Plasmid *pAct/mDs/GUS*:

$$K = -0,35D + 1,87$$

Für die erste Versuchsgruppe mit dem Plasmid *pUbi::mDs::GUS* ist K konstant, da die G/A-Ratio sich im Laufe des Versuchs nicht messbar verändert:

$$K = 13$$

Für die zweite Versuchsgruppe mit *pUbi::mDs::GUS* gilt:

$$K = -0,67D + 3,35.$$

Nach Multiplikation mit den jeweiligen Korrekturfaktoren können die Ergebnisse der zwei Versuchsgruppen, deren Proben mit *pUbi::mDs::GUS* transformiert worden sind zu Mittelwerten zusammengefasst werden.

3.4.3 Semi-transiente Tests der *Ac*-Transposase-Aktivität an *Ac*-, *Ac*₁₀₃₋₈₀₇- und *UbiAc*-Gerstenlinien

Für die Detektion der *Ac*-Transposaseaktivität mittels β -Glucuronidase-Aktivitätstests sind Skutellumproben von *cwAc*-, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇-, *UbiAc*- und ‚*Golden Promise*‘- und *Igri*-Kontrollpflanzen isoliert und mit den Reportergenkonstrukten *pAct/mDs/GUS* (2.4) und *pUbi::Ds::GUS* (2.4, 2.16.2) wie oben beschrieben transformiert (3.4.1, 2.26, 2.27, 2.28) worden.

Die Aktivität der Linien wird, bezogen auf die β -Glucuronidase-Aktivität von mit *pActinGUS* oder *pUbiGUS* transformierten Positivkontrollen aus der jeweiligen Versuchsgruppe, nach Berücksichtigung des Korrekturfaktors (3.4.2) prozentual angegeben.

Es sind Individuen aus der ersten Nachfolgenergeneration der Linien *DHcwAc*₁₀₃₋₈₀₇#2, *cwAc*#3, *DHcwAc*#4, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#71, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72a, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72c, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73b, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#74, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#74m, *DHcwAc*₁₀₃₋₈₀₇#9, *UbiAc* und aus der zweiten Nachfolgenergeneration der Linien *DHcwAc*₁₀₃₋₈₀₇#2, *cwAc*#3, *DHcwAc*#4, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#71, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72c, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73b, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#74 und *DHcwAc*₁₀₃₋₈₀₇#9 verwendet worden.

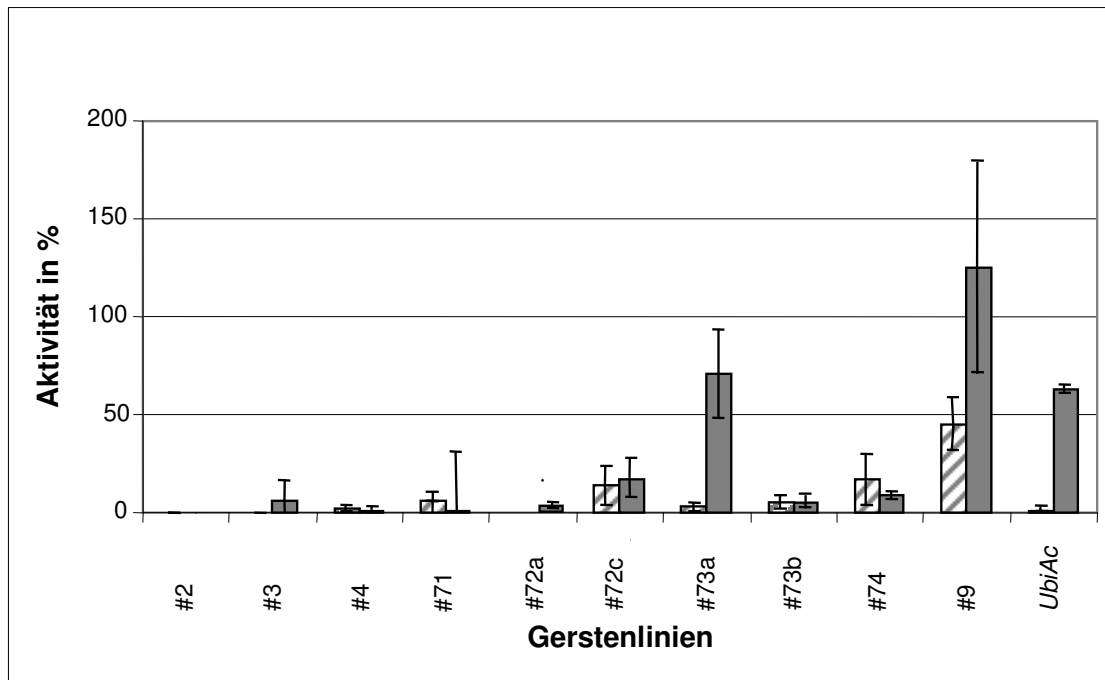


Abbildung 18: Anhand von β -Glucuronidase-Signalen gemessene Ac-Aktivitäten in Relation zu den Positivkontrollen

Aktivität gemessen an β -Glucuronidase-Signalen zwei Tage nach Transformation mit pAct/mDs/GUS (schraffierte Balken) bzw. pUbi::mDs::GUS (graue Balken) im Vergleich mit den ‚Golden Promise‘-Kontrollen mit pActinGUS bzw. pUbiGUS (100%), ebenfalls zwei Tage nach der Transformation.

Die semi-transienten Tests zur indirekten Bestimmung der Ac-Transposaseaktivität (Abbildung 18) an mehreren Ac-Transposase stabil exprimierenden Gerstenlinien zeigten, dass die Ac-Transposase Exzisionen des nicht-autonomen Elements mDs katalysiert. β -Glucuronidase-Signale als Hinweise auf Funktionsfähigkeit der Ac-Transposase finden sich bei allen charakterisierten Gerstenlinien (Abschnitte 3.1, 3.2 und 3.3) DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#2 und DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#9, cwAc#3 und DHcwAc#4, den Sublinien der Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 (cwAc₁₀₃₋₈₀₇#71, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72a, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72c, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73b und cwAc₁₀₃₋₈₀₇#74) sowie UbiAc (Abbildung 18). Dabei zeigen sich Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Linien.

Linie DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#9 des Genotyps *Igri* hat mit beiden Transformationskonstrukten mit 45,5% bzw. 125,1% die bei weitem höchste Aktivität, während Linie DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#2, die ebenfalls ein homozygotes Ac-Allel besitzt, in beiden Testsystemen mit 0-0,003% die niedrigste Aktivität zeigt. Alle anderen Linien haben stark variierende Aktivitäten, die auch je nach Testsystem unterschiedlich ausfallen können (3.4.1).

Die Linien *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a* und *UbiAc* des Kultivars ‚*Golden Promise*‘ und die Linie *DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#9* des Kultivars *Igri* sind mit Aktivitäten von 71, 63 und 125% wesentlich aktiver als die anderen Linien.

3.4.4 Auswertung von einzelnen Skutellumproben der heterozygoten Linien *cwAc#3* und *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7*

Bei den nicht-homozygoten Linien *cwAc#3* und *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7* enthalten aufgrund von Segregation bei der Eizell- und Pollenentwicklung nicht alle Skutellumproben das *Ac*-Element. Die Auswertung von Skutellumproben ist für diese Gerstenlinien einzeln durchgeführt worden. Dabei wird die Anzahl Anthocyaninsignale für jedes Skutellum mit der Anzahl β -Glucuronidase-Signale korreliert, um einzelne Proben ohne Signale von der Auswertung auszunehmen. Die Verteilung der Signale auf die einzelnen Skutellumproben der Linien *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7* und *cwAc#3* ist in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt. Werte für Linie *cwAc#3* sind für die einzelnen Pflanzen angegeben (Abbildung 19).

Ersichtlich ist, dass bei Linie *cwAc#3* im Mittel nur knapp 10 % der transformierten Skutellumproben überhaupt β -Glucuronidase-Signale aufweisen. Nur eine Pflanze (*cwAc#3/9/1*) zeigt auf über 20% der Skutellumproben GUS-Signale, ihre Aktivität verglichen mit der Positivkontrolle beträgt aber insgesamt nur ca. 5% (Abbildung 19).

Die Pflanze *cwAc#3/21/5* hat eine *Ac*-Aktivität von über 20% im Vergleich zur Positivkontrolle, jedoch befinden sich die Signale auf unter 20% der für diese Pflanze ausgewerteten Skutellumproben.

Aufgrund des möglicherweise im homozygoten Zustand letalen Integrationsorts der beiden *Ac*-Elementkopien bei Linie *cwAc#3*, enthalten nur zwei Drittel der gebildeten Zygoten überhaupt *Ac*-Elemente. Da es sich beim Skutellum um einen Teil des embryonalen Gewebes handelt, dürfte also ein Drittel der getesteten Skutellumproben ohnehin kein *Ac*-Element enthalten, was die Aktivität um ein Drittel niedriger erscheinen lassen würde, als sie tatsächlich ist. Demnach wäre die Aktivität der Linie *cwAc#3* im Mittel nicht 5,7% sondern 8,6%.

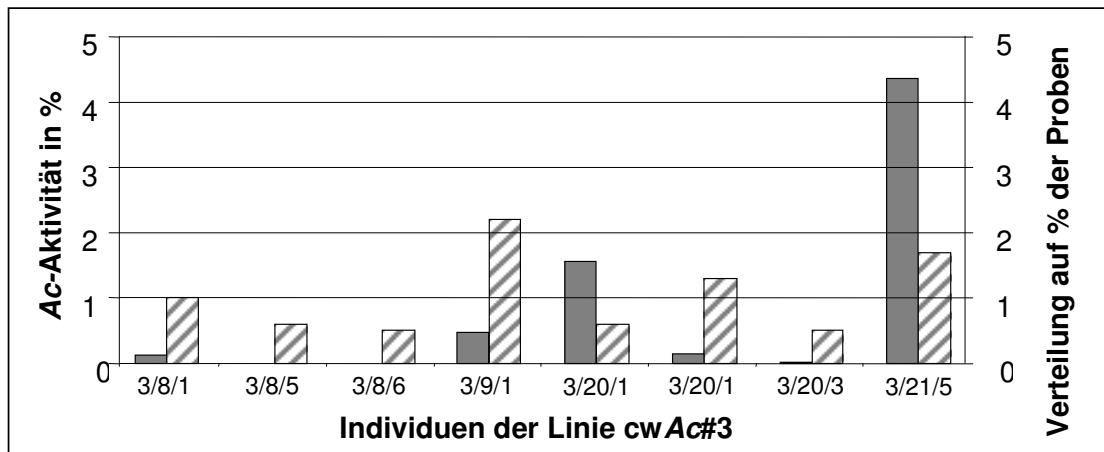


Abbildung 19: Auswertung von einzelnen Skutellumproben der Linie cwAc#3

Anzahl β -Glucuronidase-Signale einzelner Skutellumproben pflanzenweise zusammengefasst (graue Balken), zwei Tage nach Transformation mit $pUbi::mDs::GUS$ in Prozent bezogen auf ‚Golden Promise‘-Positivkontrollen mit $pUbiGUS$ (100%). Verteilung der Signale auf die einzelnen Skutellumproben in Prozent der ausgewerteten Proben (grau schraffierte Balken).

Im Vergleich dazu haben bei der homozygoten Linie $DHcwAc_{103-807}\#9$, die eine Ac -Transposaseaktivität von 125% aufweist, ca. 60% der Skutellumproben mit Anthocyanisignalen auch β -Glucuronidase-Signale (Abbildung 18). Da Exzisionsereignisse auch bei sehr aktiven homozygoten Linien nicht in allen Skutellumproben stattfinden, kann eine extrapolierende Aussage über das Vorhandensein des Ac -Elements in den Zellen einzelner Skutellumproben nicht getroffen werden.

Für die Sublinien von $cwAc_{103-807}\#7$ sind die Aktivitätsmesswerte jeweils linienweise zu einem Mittelwert zusammengefasst dargestellt (Abbildung 20).

Die Ac -Transposaseaktivitäten der einzelnen Sublinien der Linie $cwAc_{103-807}\#7$ sind sehr variabel. Bei den Sublinien weisen im Mittel nur etwa 30 Prozent der transformierten Skutellumproben β -Glucuronidase-Signale auf. Da einige der Sublinien homozygot und andere heterozygot sind, jedoch die Verteilung der Signale annähernd gleichmäßig ist, konnten hier ebenso wie bei der Linie $cwAc\#3$ keine Proben gezielt aus der Auswertung ausgeklammert werden. Es erscheint also sinnvoll, die Aktivität nicht mit einer absoluten, sondern einer gemittelten $Ac_{103-807}$ -Kopienanzahl pro Sublinie zu korrelieren (Tabelle 22).

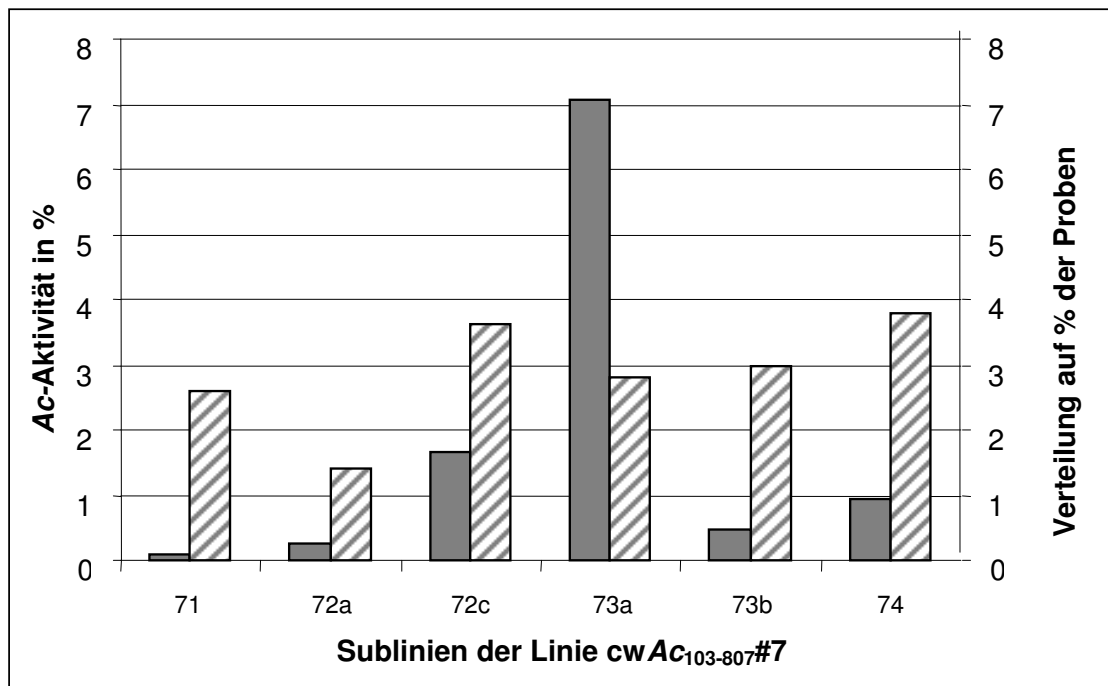


Abbildung 20: Vergleich der Ac-Transposaseaktivitäten der cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7-Sublinien

Anzahl β -Glucuronidase-Signale einzelner Skutellumproben sublinienweise zusammengefasst (graue Balken), zwei Tage nach Transformation mit pUbi::mDs::GUS in Prozent bezogen auf ‚Golden Promise‘-Positivkontrollen mit pUbiGUS (100%). Verteilung der Signale auf die einzelnen Skutellumproben in Prozent der ausgewerteten Proben (schraffierte Balken).

Tabelle 22: Ac-Transposaseaktivitäten der cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7-Sublinien unter Berücksichtigung der Anzahl von Ac₁₀₃₋₈₀₇-Elementen

Sublinie	Status	Mittlere Anzahl ¹	Akt. in % der Proben ²	Aktivität in % ³	Aktivität pro Kopie
cwAc ₁₀₃₋₈₀₇ #71	homozygot	2	26 (26)	1 (1)	0,5
cwAc ₁₀₃₋₈₀₇ #72a	heterozygot	3	19 (14)	9 (3)	3
cwAc ₁₀₃₋₈₀₇ #72c	heterozygot	3	48 (36)	28 (17)	9
cwAc ₁₀₃₋₈₀₇ #73a	homozygot	6	28 (28)	71 (71)	12
cwAc ₁₀₃₋₈₀₇ #73b	heterozygot	4	40 (30)	8 (5)	2
cwAc ₁₀₃₋₈₀₇ #74	heterozygot	5	51 (38)	11 (9)	2

¹Mittlere Ac₁₀₃₋₈₀₇-Kopienanzahl pro Zelle in einer Linie berechnet an der Wahrscheinlichkeit von homozygoten und heterozygoten Pflanzen unter per PCR oder Southern-Blot als positiv charakterisierten Individuen

²Signale in % der Proben die das Gen enthalten (Signale in % aller ausgewerteten Proben)

³Aktivität in % im Vergleich zu den Positivkontrollen nach Berücksichtigung des Korrekturfaktors (3.4.2)

Die mittlere Ac₁₀₃₋₈₀₇-Transposaseaktivität (Tabelle 22) steigt in den Sublinien von cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 mit zunehmender Kopienzahl.

4. Diskussion: Regulation der Ac-Transposase-Aktivität in Gerste (*Hordeum vulgare* L.)

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse und Charakterisierung der Aktivität von Ac-Transposase in Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Die Untersuchung von Ac im heterologen Organismus Gerste kann zum Verständnis der Regulationsmechanismen des ursprünglich aus Mais (*Zea mays* L.) stammenden Ac-Elements beitragen. Insbesondere sind die Prozessierung von Ac-Transkripten durch Sequenzierung PCR-amplifizierter Transposase-cDNA (3.3) und die Ac-Transposase-Aktivität in charakterisierten Gerstenlinien untersucht worden (3.4).

Die Aktivität transponierbarer Elemente besteht darin autonome und nicht-autonome transponierbare Elemente aus dem Genom zu exzidieren und wieder ins Genom zu integrieren (McClintock 1953). Diese Aktivität wird beim Ac/Ds-System sowohl in ‚trans‘ durch die Menge verfügbarer aktiver Transposase als auch in ‚cis‘ durch die Zugänglichkeit der terminalen Sequenzen des Exzisionssubstrats bestimmt. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Ac-Transposase, also der ‚trans‘-Komponente der Aktivität.

Für die Regulation des transponierbaren Elements Ac in Mais wird schon lange der sogenannte ‚Dosisseffekt‘ postuliert (McClintock 1948, McClintock 1951, Keller *et al.* 1993, Scofield *et al.* 1993). Es handelt sich hierbei um die Tatsache, dass im Mais eine höhere Anzahl von Ac-Transposasegenen nicht etwa zu einer erhöhten Transposase-Expression und Transposase-Aktivität führt, sondern dass im Gegenteil ab einer bestimmten Anzahl von Genkopien eine Verzögerung der Transposition und Verringerung der Transpositionsfrequenz auftritt (McClintock 1948, 1951).

Der Einfluss der Kopienzahl auf die Expression von Ac scheint in unterschiedlichen Systemen zu variieren: In Mais (McClintock 1948 und 1951, Kunze *et al.* 1997), den heterologen Pflanzen Reis (*Oryza sativa* L., Greco *et al.* 2001) und Weizen (*Triticum aestivum* L., Takumi *et al.* 1999) besteht auf den ersten Blick eine negative Korrelation zwischen der Anzahl Ac-Elemente im Genom und ihrer Aktivität. Es gibt jedoch auch einige Ac-Elemente, die in diesen Pflanzen einen positiven Dosierungseffekt aufweisen (Heinlein 1996, Brutnell *et al.* 1997).

In dikotylen heterologen Systemen wie *Arabidopsis thaliana* (Grevelding *et al.* 1992), Petunie (*Petunia hybrida*, Becker *et al.* 1992, Heinlein *et al.* 1994) und Tabak (*Nicotiana tabacum* L., Keller *et al.* 1993, Scofield *et al.* 1993, Martin *et al.* 1997) besteht bis zu einem bestimmten Expressionsniveau eine positive Korrelation. Es finden also bis zu einer bestimmten Anzahl

Genkopien bzw. bei Verwendung nicht-nativer starker Promotoren mehr und in der Entwicklung der Pflanze früher erfolgende Transpositionereignisse statt (Scofield *et al.* 1993).

Bemerkenswert ist, dass das transponierbare Element *Ac* in den hier vorgestellten Ergebnissen in Gerste zunächst anscheinend wie in dikotylen Pflanzen eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der Elemente im Genom und der Aktivität der Transposase aufweist.

Für die dauerhafte Funktionsfähigkeit der *Ac*-Transposase in Gerste ist notwendig, dass die Integration des transponierbaren Elements ins Gerstengenom stabil ist. Das kann durch die Verwendung eines immobilisierten *Ac*-Transposase-exprimierenden Elements wie *cwAc*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇* oder *UbiAc* erreicht werden. Die Analysen bestätigen für alle untersuchten Gerstenlinien die Integration von immobilisierten *Ac*-Elementen (3.2.1).

Um die Exzisionsaktivität von *Ac* in Gerste zu beobachten, ist ein neues semi-transientes Testsystem verwendet worden. Dieses Testsystem dient der Ermittlung der Aktivität an Explantaten: Es liefert mit Ergebnissen ‚*in planta*‘ (McElroy *et al.* 1997, Lazarow 2006) vergleichbare Werte, die jedoch schneller verfügbar sind.

Für die hier beschriebenen Versuche sind Gerstenlinien mit einer oder mehreren *Ac*-Integrationen ausgewählt worden, um die Regulation der *Ac*-Transposase zu untersuchen. Bisher war für Gerste nicht bekannt, welchen Einfluss die Anzahl und der Typ des *Ac*-Elements, der verwendete Promotor, das Gerstenkultivar oder epigenetische Effekte auf die Expression haben.

Anhand der molekular charakterisierten Gerstenlinien *DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#2*, *cwAc#3*, *DHcwAc#4*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a*, *DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#9* und *UbiAc* sowie der Maislinien *PI-vv::Ac* und *A188* können die Effekte unterschiedlicher Integrationsorte, unterschiedlicher Promotoren (*Ac*-Wildtyp-Promotor und *Ubiquitin1*-Promotor), unterschiedlicher Genvarianten (Wildtyp und Deletionsvariante *Ac₁₀₃₋₈₀₇*), sowie der unterschiedlichen Wirtspflanzen Gerste und Mais auf die detektierbaren *Ac*-Transkripttypen und die *Ac*-Aktivität untersucht werden. Zusätzlich ist die Linie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#74m* verwendet worden, deren *Bam*HI-Restriktionsmuster andeutet (3.2), dass an einigen *Ac*-Genorten der regenerierten Pflanze eine Methylierung des Promotorbereichs vorliegt.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen,

1. dass alle untersuchten Gerstenlinien diploid sind und stabil in Genom integrierte *Ac*-Elemente enthalten (3.1, 3.2) und somit für *Transposon-Tagging*-Systeme geeignet sind,

2. dass die Aktivität von *Ac* in Gerste mit steigender Dosis zunächst zunimmt (3.2, 3.4)
3. dass *Ac*-Transposase auch in den Gerstenlinien ohne messbare *Ac*-Transposaseaktivität transkribiert wird (3.3, 3.4),
4. dass alle untersuchten Pflanzen korrekt gespleißte *Ac*-Transkripte produzieren (3.3),
5. dass ein bedeutender Anteil der Transkripte alternativ gespleißt wird (3.3),
6. dass auch in Mais, wenn auch in geringer Menge, alternativ gespleißte Transkripte vorkommen (3.3) und
7. dass in Gerste der verwendete Promotor keinen Einfluss auf die Aktivität hat.

4.1 Nachweis stabiler, teilweise doppelhaploider *Ac*-, *Ac*₁₀₃₋₈₀₇ und *UbiAc*-Gerstenlinien mit immobilisierten Transposons

Die Verwendung von homozygoten *Ac*-Transposase-Pflanzen ermöglicht es, in späteren Untersuchungen von einer definierten und gleichbleibenden Anzahl von *Ac*-Transposasegenen im Genom der einzelnen Individuen einer Linie auszugehen. So können gezielt Gerstenlinien mit hoher *Ac*-Transposaseexpression für Kreuzungsversuche ausgewählt werden.

Als Ausgangsmaterial haben für die hier vorgelegten Untersuchungen Linien mit dem immobilisierten *Ac*-Element und Linien mit der Deletionsvariante *Ac*₁₀₃₋₈₀₇ (Scholz 2000) sowie Linien mit der Promotorvariante *UbiAc* (Koprek *et al.* 1999) zur Verfügung gestanden. Die jeweiligen Konstrukte waren durch biolistische Transformation in das Genom der Gerstenlinien integriert worden (Koprek *et al.* 2000, Scholz 2000). Die historisch erste stabile Transformation von Gerste der Kultivare ‚*Golden Promise*‘ und *Igri* wurde durch Partikelbeschuss von Embryonen erreicht (Wan und Lemaux 1994, Lemaux *et al.* 1996).

Das immobilisierte *Ac*-Element ist in Gerste über mehrere Generationen in den hier untersuchten Linien nachweisbar (3.1, 3.2). Für weitere Analysen sind doppelhaploide *Ac*-Gerstenlinien aus bereits vorhandenen *Ac*-Gerstenlinien mittels Mikrosporenkultur (2.25, 2.26, 2.27, nach Jähne *et al.* 1994) regeneriert worden.

Die Restriktion genomischer DNA der *Ac*-Linien mit den Enzymen *Bam*HI, *Hind*III oder *Xba*I, die jeweils eine einzelne Schnittstelle im *Ac*-Element aufweisen, und die anschließende Analyse mittels Southern-Blot, dienen dazu, die Anzahl *Ac*-Elemente im Gerstengenom festzustellen. Bei den Linien *cwAc*#3, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#7 und *UbiAc* treten bei Restriktion mit den verschiedenen Enzymen jeweils unterschiedliche Ergebnisse auf (3.2.2). Diese scheinbaren

Widersprüche lassen sich durch Umarrangements der transgenen *Ac*-Fragmente bei der biolistischen Transformation erklären und weisen auf unvollständige *Ac*-Integrationen ins Genom der Gerstenlinien hin.

Gekoppelte Mehrfachintegrationen, Umarrangements der eingebrachten DNA und der Wirtssequenzen können während der Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* (Kumar und Fladung 2000) ebenso wie bei der Transformation mittels Partikelbeschuss (Pawlowski und Somers 1998) auftreten. Demnach sind vermutlich auch bei den hier untersuchten Gerstenlinien Sequenzen umarrangiert. Bei Mehrfachintegrationen können einzelne Kopien unabhängig voneinander vererbt werden. Eine getrennte Vererbung zweier unterschiedlicher *Ac*-Wildtyp-Integrationen wurde bereits vorher in Gerste beobachtet (Scholz 2000).

Bei Linie cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73b (3.2.4.2) scheint der Verlust einer *Ac*-Kopie vorzuliegen, der durch Rekombination verursacht worden sein kann, da er seltener auftritt, als es bei unabhängiger Vererbung wahrscheinlich wäre. Die Kombination von *Ac*-Kopien der Linie cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73b ist nur einmal in der ersten Nachkommengeneration beobachtet worden. Ob die Rekombination in direkter Nachbarschaft zum Element stattfindet oder ob diese Entkopplung von *Ac*-Kopien Folge einer Rekombination an einer anderen Stelle im Genom ist, kann ohne weitere Untersuchungen nicht entschieden werden.

In bis zu 50% der Fälle folgt die Expression von in Pflanzen eingebrachten Genen in den Nachkommen nicht den mendelschen Regeln (Linn *et al.* 1990, Mittelsten-Scheid *et al.* 1991, Yin *et al.* 2004). Solche genetische Instabilität kann unterschiedliche Ursachen haben: Exzision des Transgens, Umarrangements des Transgens durch homologe Rekombination und Inaktivierung des Transgens durch epigenetische Effekte wie etwa die Methylierung des Promotors (Linn *et al.* 1990, Kilby *et al.* 1992, Meyer *et al.* 1993, Kumpatla *et al.* 1997, Koprek *et al.* 2001).

Im untersuchten System ist Transposition jedoch als Ursache der nicht-mendelschen Vererbung von *Ac*-Elementen auszuschließen, da die *Ac*-Elemente durch Deletion von fünf Basen in den 5'-*TIR* (Healy *et al.* 1993) immobilisiert worden waren. Die Sequenz an den 5'-Enden ist durch PCR-basierte Amplifikation (2.16) und Sequenzierung überprüft worden (3.1, 3.2).

Zusammengefasst ist also der Nachweis stabiler, teilweise doppelhaploider *Ac*-, *Ac*₁₀₃₋₈₀₇ und *UbiAc*-Gerstenlinien mit immobilisierten Transposons erbracht worden.

4.2 Dosisseffekt und Regulation von *Ac* in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) im Vergleich mit anderen Organismen

Um Aussagen über die Dosis-Korrelation in Gerste zu ermöglichen, sind die Anzahl vollständiger *Ac*-Kopien im Gerstengenom bestimmt (3.2.2 und 3.2.3) und ein neues semi-transientes Testsystem für die *Ac*-Aktivität entwickelt worden (3.4).

Die Restriktion von genomischer Gersten-DNA mit der Enzymkombination *Bam*HI und *Pac*I ist dazu geeignet, *Ac*-Elementintegrationen mit einem funktionellen *Ac*-Transposase-Gen einschließlich Promotor (Fridlender *et al.* 1998) und Polyadenylierungssequenz zu detektieren (3.2.3), das ausreichend für die Expression von Transposase ist. Die *cwAc*-, *Ac*₁₀₃₋₈₀₇- oder *UbiAc*-Elemente sind in allen untersuchten Linien mindestens einmal vollständig ins Genom integriert (3.2.3).

Durch Southern-Blot-Analysen mit *Pac*I und *Bam*HI sowie mit *Bam*HI, *Hind*III oder *Xho*I, die jeweils nur eine Schnittstelle im *Ac*-Element aufweisen, ist festgestellt worden, dass die Linie *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#2 eine intakte Kopie, *cwAc*#3 zwei, *cwAc*#4 zwei, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#74 vier, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a und *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73b drei, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72a und *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72c zwei Kopien, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#71 eine Kopie, *UbiAc* drei Kopien und *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#9 eine Kopie enthalten. Zusätzlich sind Hinweise auf zusätzliche umarrangierte Fragmente bei Linie *cwAc*#3 gewonnen worden (3.2).

Es ist für die Pflanzen der Linie *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#7 und deren Sublinien jeweils mindestens eine vollständige Integration gefunden worden. Die Sublinien von Linie *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#7 zeigen in *Pac*I-*Bam*HI-Restriktionen zudem ausschließlich das vollständige Fragment (3.2.3). Dieser Sachverhalt lässt darauf schließen, dass das Fragment im Muster der Linie *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#71 und eins der beiden Fragmente in *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72c intakt sind.

Die *cwAc*-, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇- und *UbiAc*-Elemente können in allen untersuchten Gerstenlinien Exzisionen von nicht-autonomen *mDs*-Elementen hervorrufen, wenn beide Elemente zusammen in den Zellen eines Gewebes vorliegen (3.4). Dies Ergebnis zeigt, dass alle Linien funktionsfähige Transposase exprimieren. Die Aktivitäten variieren zwischen 0,003% bei Linie *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#2 und 125,1% bei Linie *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#9 jedoch erheblich (3.4.3). Die homozygoten Linien *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a und *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#9 weisen wesentlich höhere Aktivitäten als die anderen Linien auf, obwohl sich die Linien untereinander in der Verteilung von Signalen auf den einzelnen Gewebeproben nicht stark voneinander unterscheiden.

Es lässt sich entgegen ersten Beobachtungen bei den monokotylen Pflanzen Mais (McClintock 1948 und 1951, Kunze *et al.* 1997) und Gerste sowie beim dikotylen Tabak (Keller *et al.* 1993, Scofield *et al.* 1993, Martin *et al.* 1997) der gleiche Verlauf der Dosis-Korrelation beobachten. Zunächst ist eine positive Korrelation zwischen Dosis und Aktivität feststellbar, ab einer bestimmten Menge *Ac*-Kopien eine Änderung zu inverser Korrelation, also ab einem bestimmten Expressionsniveau Rückgang der Aktivität. In *wx-m9*-Mais beispielsweise steigt die Aktivität zunächst mit der Dosis: Die Aktivität eines *Ac*-Elements, gemessen an der Anzahl revertierter Sektoren, beträgt 18%, die von 2 *Ac*-Elementen 82% und die von 3 *Ac*-Elementen 24% (Heinlein 1996). In *bz-m2*-Mais hat ein einzelnes *Ac*-Element mit 56% die höchste Aktivität, bei zunehmender Anzahl sinkt die Aktivität kontinuierlich auf nur 1,5% bei 3 *Ac*-Elementen (Heinlein 1996). Die *Ac*-Elemente in den Linien *wx-m9* und *bz-m2* unterscheiden sich nicht in ihrer Sequenz, sondern nur in ihrer Orientierung zum nächstgelegenen Promotor und damit in ihrer Expression (Heinlein 1996). Die genomische Umgebung am Integrationsort kann also die Aktivität und damit den Dosiseffekt beeinflussen. Dieser Sachverhalt sollte bei der Bewertung von Ergebnissen zur Dosis-Korrelation berücksichtigt werden.

Die *Ac*-Aktivität in Mais ist nur teilweise von der Aktivität des *Ac*-Promotors und der Menge des *Ac*-Transposasetranskripts abhängig, da die Translationseffizienz (Fußwinkel *et al.* 1991) und die Bildung von Aggregaten (Kunze *et al.* 1993, Heinlein *et al.* 1994) die verfügbare Transposasemenge beeinflussen. Zusätzlich hat die *Ac*-Transposase durch Bindung an die subterminalen Repeats eine expressionsupprimierende Wirkung auf den eigenen Promotor (Fridlender *et al.* 1996). Die Regulation der Transposase-Expression unterliegt also einem komplexen Mechanismus, der vermutlich die negative Autoregulation der Expression durch das Transposase-Protein beinhaltet (Kunze und Weil 2002).

Als Ausgangspflanzen sind homozygote und heterozygote Pflanzen ausgewählt worden. Die für die *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7*-Sublinien *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#71* und *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a* ausgewählten Regenerate sind homozygot. Die anderen Sublinien *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72a*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#72c*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73b* und *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#74* sind heterozygot. In den Primärregeneraten der *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7*-Sublinien ist in 98% aller Pflanzen das *Ac*-Element nachweisbar (3.1.3, 3.2.4.2), so dass weitere teilweise charakterisierte Pflanzen zur Auswahl stehen. Hier sind Positionseffekte weitgehend auszuschließen, da die Sublinien alle die gleichen Allele, wenn auch in unterschiedlicher Anzahl und Kombination, enthalten.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente lassen für *Ac* und *Ac*₁₀₃₋₈₀₇ im Gerstenskutellum bis zu einer bestimmten Anzahl *Ac*-Kopien ebenfalls eine positive Korrelation vermuten. Die homozygote Gerstenlinie *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a weist mit sechs die höchste Anzahl *Ac*-Kopien und im Vergleich mit den anderen *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#7-Sublinien die höchste Aktivität auf.

Die Linie *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a ist die Linie mit der höchsten gemessenen *Ac*-Transposaseaktivität und damit weit aktiver als andere *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#7-Sublinien. Die homozygoten Linien *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a und *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#9 weisen höhere Aktivitäten als die anderen Linien auf, obwohl sich die Linien in der Anzahl von Signalen auf den einzelnen Gewebeproben nicht von anderen unterscheiden.

Von den *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#7-Sublinien hat *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#71 die niedrigste mit *pUbi::mDs::GUS* gemessene Aktivität. Die Aktivitäten von *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#71 und *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72a addieren sich beinahe zu der von *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73b, jedoch sind keine weiteren Regelmäßigkeiten erkennbar, die es ermöglichen würden, den einzelnen *Ac*-Integrationen Aktivitäten zuzuweisen.

Die heterozygoten Linien *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72a und *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72c enthalten ebenfalls zwei *Ac*-Kopien und weisen auch nur sehr geringe *Ac*-Aktivitäten auf.

Der Mittelwert von 2,6% der mit *pAct/mDs/GUS* und *pUbi::mDs::GUS* gemessenen relativen Aktivitäten der Linie *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72a ergibt zusammen mit der Aktivität von 16,6% der Linie *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72c einen weit geringeren Wert als den von 70,7% für *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a (Abbildung 20). So ergeben etwa die mit *pUbi::mDs::GUS* gemessenen Aktivitäten von 0,8% für *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#71 und 2,6% für *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#72a, die drei unterschiedliche *Ac*-Elementkopien enthalten, annähernd die von 4,5% für *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73b, die alle drei *Ac*-Elementkopien gemeinsam enthält (Abbildung 20, vgl. Abschnitt 3.3). Die heterozygote Linie *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#74 ist weit weniger aktiv als die Hälfte der Summe der Aktivitäten von *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#71 und *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a.

In den von Linie *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#7 abgeleiteten Sublinien ist bei Pflanzen mit bis zu sechs Kopien eine positive Korrelation zwischen Anzahl und Aktivität zu beobachten.

Da die Aktivitäten von 0,8% bei *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#71 und 70,7% bei *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#73a zusammen weit höher sind als 9,2% bei *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇#74, spielt möglicherweise ab einem bestimmten *Ac*-Expressionsniveau die für *Ac* bekannte Autosuppression (Fridlender *et al.* 1996, Essers *et al.* 2000) eine Rolle. Dabei wird entweder die *Ac*-Aktivität in den Gerstenzellen herunterreguliert, die einzelnen Dimere treten zueinander in Konkurrenz (Fußwinkel *et al.* 1991), oder die Menge aktiver Transposase-Dimere wird durch die Bildung immer größerer Aggregate reduziert.

Die Sublinien von cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 exprimieren die verkürzte Ac₁₀₃₋₈₀₇-Transposase. Für diese Transposase wurde in Petunienprotoplasten (Houba-Hérin *et al.* 1990) und in Tabak (Kunze *et al.* 1995) eine gegenüber dem Wildtyp-Ac-Element höhere Transpositionsaktivität gezeigt. In den hier beschriebenen Versuchen zeigen einige Sublinien der Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 eine erhöhte Aktivität im Vergleich zu den anderen Linien.

Bei vorherigen Tests mit somatischem Gewebe von Kreuzungsnachkommen der Mikrosporenmutterpflanzen und mDs-Gerstenlinien wurde die Ac-Transposaseaktivität durch die Detektion der Expression des GUS-Reportergens ermittelt. Dabei mobilisierte die Linie cwAc#4 das mDs-Element in bis zu 68% der Nachkommenpflanzen, während cwAc#3 bei 100% der Nachkommenpflanzen das mDs-Element mobilisierte (Lazarow, pers. Mitteilung). Die bei Linie cwAc#3 höhere Aktivität korreliert mit den Ergebnissen aus den Aktivitätstests mit pAct/mDs/GUS, hat sich jedoch mit pUbi::mDs::GUS nicht bestätigen lassen (3.4.2). Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2 erreichte in Kreuzungen mit der gleichen mDs-Linie Exzisionen in 87% der Nachkommenpflanzen (Lazarow, pers. Mitteilung). In semitransienten Tests (3.4.2) zeigte Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2 die niedrigste Aktivität.

Obwohl in Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2 die Ac-transposaseexprimierenden Elemente homozygot vorhanden sind, zeigt diese Linie sehr geringe oder keine semitransient messbare Aktivität. Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2 weist durchgehend die niedrigste Aktivität auf, obwohl sie genau wie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#71 und die Igr-Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9 jeweils zweimal die gleiche Ac-Integration enthält. Diese Beobachtung bestätigt den Einfluss der genetischen Umgebung auf die Aktivität von Ac. In beiden Test-Plasmid-Systemen (pAct/mDs/GUS und pUbi::mDs::GUS) erreicht Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9 im Vergleich mit den anderen Gerstenlinien die höchste Exzisionsaktivität.

Ac-Anzahl, Promotorstärke, Transkript- und Proteinmenge weisen in monokotylen und dikotylen Pflanzen sowie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eine direkte Korrelation zueinander auf (Kunze *et al.* 1987, Fußwinkel *et al.* 1991, Scofield *et al.* 1992, Scofield *et al.* 1993, Swinburne *et al.* 1992, Keller *et al.* 1993, Heinlein *et al.* 1994, McElroy *et al.* 1997, Takumi *et al.* 1999). Diese Korrelation gilt jedoch nicht für die Aktivität, die ab einem bestimmten Expressionsniveau wieder abnimmt.

In Gerste besteht keine direkte Korrelation zwischen der Aktivität der Ac-Transposase und dem zur Expression verwendeten Promotor. Die Linie UbiAc mit drei intakten heterozygoten

Ac-Integrationen hat zwar eine vergleichsweise hohe *Ac*-Transposaseaktivität, die Linien DHcw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#73a und DHcw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇#9 mit insgesamt sechs bzw. zwei *Ac*-Kopien weisen aber höhere Aktivitäten auf. Andere cw*Ac*₁₀₃₋₈₀₇-Linien weisen weit niedrigere Aktivitäten als *UbiAc* auf, die denen der Linien cw*Ac*#3 und cw*Ac*#42 mit den darin enthaltenen nativen *Ac*-Transposase-Quellen vergleichbar sind.

Ac zeigt in Gerste auch in transienten Experimenten anderer Forschergruppen (Koprek *et al.* 2000) unter der Kontrolle des nativen *Ac*-Promotors sowie des *Ubiquitin1*-Promotors sehr variable Aktivitäten, die jedoch auch nicht mit dem Promotor korrelieren (Koprek *et al.* 2000). Die Signalzahlen von 0,2 bis 2,1 pro Skutellum in den Kreuzungsnachkommen (Koprek *et al.* 2000) sind vergleichbar mit den hier erzielten Ergebnissen von im Mittel 2,2 Signalen pro Skutellum (3.4.3), wobei die Werte im Bereich von 0,1 bis 40,1 Signalen variieren.

Der Effekt unterschiedlicher Promotoren auf die Expression von *Ac* in Gerste wurde bereits in transienten Tests durch Transformation mit unterschiedlichen Plasmiden untersucht (McElroy *et al.* 1997). Dazu wurde mit jeweils zwei Genen des Anthocyanstoffwechsels als Erfolgskontrolle, einer *Ubi-Ac*-Transposase-Quelle, dem von *Ds* unterbrochenen Reportergen *Act1-uidA* mit *WDV*-Replikationsassoziierte-Region und dem Gen des *WDV*-Replikationsassoziierten Proteins zur Replikation des Reporterplasmids ko-transformiert (McElroy *et al.* 1997). In diesem transienten Testsystem ist in Gerste eine positive Korrelation zwischen Promotorstärke und Aktivität zu erkennen (McElroy *et al.* 1997): Relativ zu *Act1GUS* liefert die Ko-transformation mit den Konstrukten *Act1-Ds-GUS* und dem promotorlosen *Ac* eine Aktivität von 3,8%, mit *35S-Ac* 15,9% und mit *Ubi-Ac* 22,3% (McElroy *et al.* 1997). Die Ergebnisse sind jedoch nach Aussage der Autoren sehr variabel (McElroy *et al.* 1997). Das System besteht aus in der Zelle replizierenden Plasmiden, die eine *WDV*-Replikationsassoziierte-Region und das Gen des *WDV*-Replikationsassoziierten Proteins enthalten (McElroy *et al.* 1997). Die Replikation des Plasmids führt jedoch dazu, dass die *Ac*-Menge in den Zellen nicht konstant ist und nicht exakt reproduziert werden kann, was die variablen Ergebnisse erklären würde.

In stabil mit *Ac*-Konstrukten transformierter Gerste wurde ebenfalls eine sehr variable *Ac*-Transposase-Expression bei genetisch gleichen Pflanzen festgestellt (Koprek *et al.* 2000). Bei Konstrukten mit *Ac* unter Kontrolle des nativen Promotors oder des *Ubiquitin1*-Promotors schien die Kopienzahl keinen Einfluss auf die Transpositionsfrequenz zu haben, so dass zwischen der *Ac*-Aktivität und der Stärke des zur Expression verwendeten Promotors in Gerste eine Korrelation nicht zu bestehen scheint (Koprek *et al.* 2001): Das wt-*Ac*-Konstrukt

lieferte semi-transient relative Aktivitäten von 0,5 bis 1,4%, *Ubi1-Ac* von 0,3 bis 2,1% (Koprek *et al.* 2001). *In planta* war *wt-Ac* zu 16 bis 38% aktiv und *Ubi1-Ac* zu 7 bis 47% (Koprek *et al.* 2001). Bei dem *Ubi1-Ac*-Konstrukt traten die Transpositionereignisse jedoch früher in der Pflanzenentwicklung auf (Koprek *et al.* 2000). Die Transpositionsfrequenz *in vivo* korreliert mit der in semitransienten-Test gemessenen (Koprek *et al.* 2000).

In *Arabidopsis thaliana* ist eine deutliche Korrelation der Aktivität mit dem jeweils verwendeten Promotor zu erkennen (Swinburne *et al.* 1992). Das *Ac*-Element liefert in der F1- und F2-Generation unter der Kontrolle des starken *35S*-Promotors, des *ocs*-Promotors und der schwachen Promotoren *Ac* und *nos* mit der jeweiligen *Ac*-mRNA-Menge korrelierende Aktivitäten (Swinburne *et al.* 1992). Um die *Ac*-Aktivität im Detail untersuchen zu können, ist bei den vorgelegten Untersuchungen für Gerste ein neues semi-transientes Testsystem entwickelt worden.

Die *Ac*-Aktivität steigt in Gerste bei Verwendung des *Ubi*-Promotors (3.4). Ein Anstieg der *Ac*-Aktivität gegenüber dem Wildtyp-*Ac*-Promotor wurde in Gerste (McElroy *et al.* 1997), *Arabidopsis thaliana* (Swinburne *et al.* 1992) und Tabak (Scofield *et al.* 1992) ebenfalls bei Verwendung des *35S*-Promotors beobachtet. Im Gegensatz dazu sinkt die *Ac*-Aktivität in Weizen bei Verwendung des *35S*-Promotors (Takumi *et al.* 1999).

Die *Ac*-Transposase bildet nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich die für die Aktivität notwendigen Dimere (Kunze *et al.* 1997, Essers *et al.* 2000). Es tritt also bei allen Pflanzen der gleiche Effekt auf: Zunächst korreliert der Anstieg und erst ab einem bestimmten Expressionsniveau stellt sich ein Rückgang der Aktivität ein (Abbildung 21).

Vermutlich wird der Aktivitätsrückgang von *Ac* ab einem bestimmten Expressionsniveau (Abbildung 21) dadurch hervorgerufen, dass die *Ac*-Transposase-Moleküle durch die Bildung von *Ac*-Aggregaten (Kunze *et al.* 1993, Heinlein *et al.* 1994, Essers *et al.* 2000) abgefangen werden. Eine ansteigende Menge Aggregate in der Zelle bindet und inaktiviert immer größere Mengen einzelner *Ac*-Proteinmoleküle. Eine weitere Erklärung ist, dass ein einzelnes *Ac*-Transposase-Dimer an beide Enden des *Ac*-Elements binden muss, um die Transposition zu ermöglichen, bei höheren *Ac*-Transposase-Mengen stünden die einzelnen Dimere zueinander in Konkurrenz um die Bindungsstellen (Fußwinkel *et al.* 1991).

Da das Spleißen von Transkripten einen limitierenden Faktor der Expression darstellen kann, sind auch die *Ac*-Transkripte in Gerste untersucht worden.

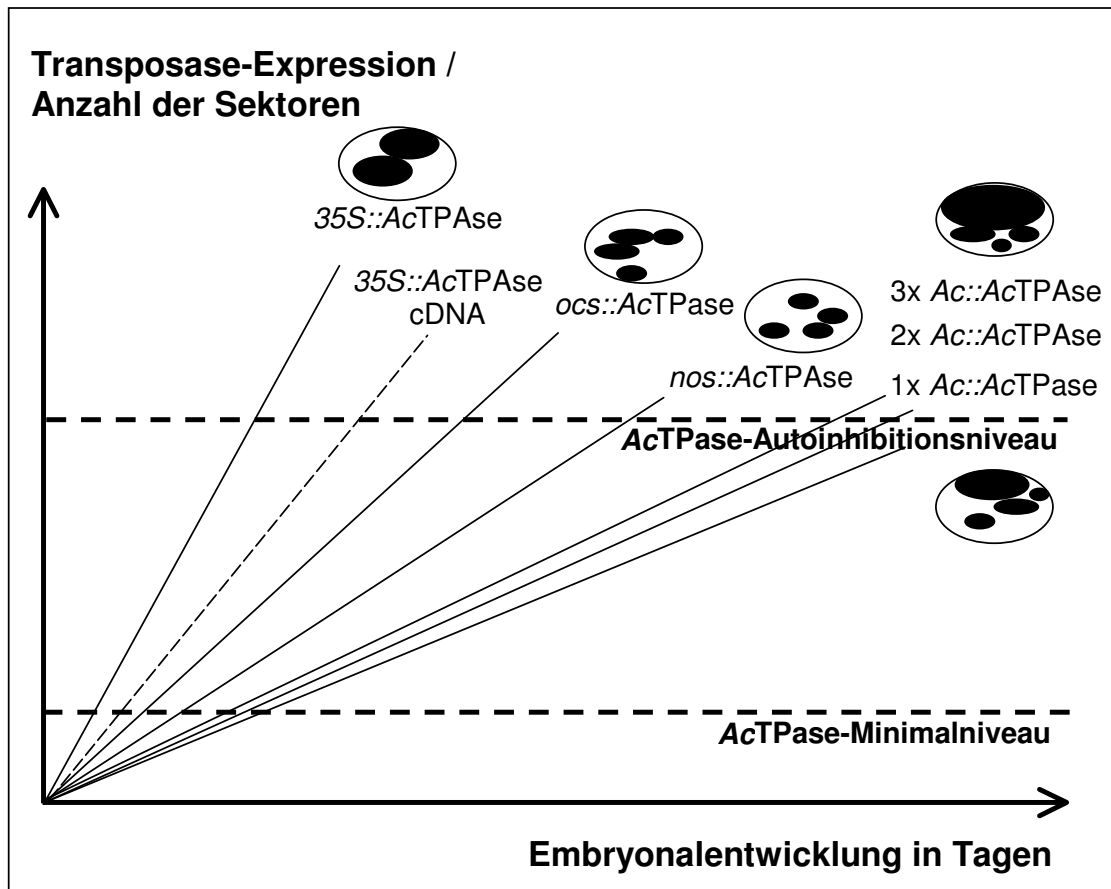


Abbildung 21: Erklärungsmodell für den Dosiseffekt bei mono- und dikotylen Pflanzen (modifiziert nach Scofield *et al.* 1993)

Während der Zellentwicklung steigt die *Ac*-Menge in der Zelle. Die *Ac*-Transposase ist aber nur zwischen einer oberen und einer unteren Grenze aktiv. Wann die Transposase in bestimmten Geweben aktiv ist, kann anhand der Anzahl und Größe der durch Transposition revertierten Sektoren (dargestellt durch schwarze Flecken) abgeleitet werden.

4.3 Generation von doppelhaploiden Gerstenlinien durch Mikrosporenkultur

Die Regeneration von doppelhaploiden Pflanzen für weitere Versuche ist nicht bei allen Linien erfolgreich gewesen, wie durch die Segregation des *Ac*-Elements bei den Linien *cwAc#3* und *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7* (3.1, 3.2) deutlich wird.

Die durch Regeneration aus Mikrosporen der Gerstenkultivare ‚*Golden Promise*‘ und *Igri* gewonnenen Pflanzen sind alle diploid (3.1). Nur aus zwei Linien des Kultivars ‚*Golden Promise*‘, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#1* und *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#8*, sind keine Pflanzen regeneriert worden.

Ein bisher für *Igri* verwendetes Protokoll (Jähne *et al.* 1994) ist erfolgreich für ‚*Golden Promise*‘ angepasst worden. Dieses angepasste Protokoll ist also das erste für das Kultivar ‚*Golden Promise*‘ erfolgreich etablierte und publizierte Protokoll für die Regeneration aus Mikrosporen.

Um den Nachweis der erfolgreichen Aufdopplung des Gerstengenoms in den Nachkommenpflanzen zu erbringen, sind Pflanzen aus drei durch Selbstung erhaltenen Generationen auf das Vorhandensein bzw. die Segregation des Transgens untersucht worden (3.1.3, 3.2.2 und 3.2.4).

Die Linien cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2, cwAc#4 und cwAc₁₀₃₋₈₀₇#9 sind erfolgreich zu doppelhaploiden Linien regeneriert worden, deren diploide Nachkommen alle das Ac-Element (3.1.3) tragen. Die Linien cwAc#3, cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 und *UbiAc* zeigen Segregation der Ac-Element-Integration. Die Ergebnisse der Southern-Blot-Analysen (3.2.2) bestätigen die Hinweise der PCR-Schnelltests (3.1.3) darauf, dass einige Linien das Ac- oder Ac₁₀₃₋₈₀₇-Element in ihren Nachkommen verlieren. Somit weisen drei der sechs erfolgreich aus Mikrosporen vermehrten Gerstenlinien in Nachkommengenerationen Individuen auf, denen das Ac-Element entweder ganz fehlt oder einzelne Elementkopien unabhängig voneinander vererbt werden und die daher diploid (3.1), aber nicht homozygot sind. Das bedeutet, dass die Dihaploidisierung von Gerstenlinien über Mikrosporenkultur nicht immer effizient verläuft. Eine Ursache dafür kann neben dem Verschmelzen genetisch unterschiedlicher Tochterkerne auch das Auftreten anderer regenerierbarer Zellen in den Mikrosporenkulturen sein.

Linie cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7 hat, wie durch eine Segregationsanalyse nach Mendel gezeigt, Ac-Integrationen an vier teilweise voneinander unabhängigen Genorten (3.2.2, Abbildung 8 und 3.2.4.2, Abbildung 11).

Die ‚*Golden Promise*‘-Linie cwAc#3 weist zusätzlich zu einer geringen Regenerationseffizienz bei der Mikrosporenkultur (3.1.1) mit nur 21% auffällig wenige regenerierte Pflanzen mit dem Ac-Element (3.1.1, 3.1.3, Tabelle 8, 3.2.1) und eine geringe Fertilität und wesentlich verlangsamtes Wachstum auf. Es liegt möglicherweise eine homozygot letale ‚*Knockout*‘-Mutante in einem für die Entwicklung der weiblichen Gameten essentiellen Gen vor, die verhindert, dass homozygote Pflanzen regeneriert werden können (3.2, Tabelle 15). Ähnliche Auswirkungen einer Transgen-Integration wurden bereits in

Tabak (*Nicotiana tabacum*) beobachtet (Budar *et al.* 1986). Eine Analyse der flankierenden Sequenzen wäre hier aufschlussreich.

Da der Phänotyp des verminderten Kornansatzes der Linie cwAc#3 bei den durch Selbstung erhaltenen Folgegenerationen beibehalten wird, kann ausgeschlossen werden, dass dies ein Effekt der Gewebekultur auf die Pflanzen ist (3.1.1). Ebenso kann ausgeschlossen werden, dass die verminderte Vitalität der Linie cwAc#3 auf eine veränderte Ploidie zurückzuführen ist, da die Pflanzen den gleichen DNA-Gehalt pro Zellkern aufweisen wie Wildtyp-Gerstenpflanzen (3.1.2).

Durch Meiose und Pollenmitose entstandene haploide Mikrosporen verdoppeln bei der Kultivierung ihren Chromosomensatz durch die Verschmelzung von zwei haploiden Tochterkernen (Chen 1977, Kasha *et al.* 2001b, Gonzalez-Melendi *et al.* 2005). Das entstehende Kallusgewebe und die daraus regenerierbare Pflanze sind diploid. Bei der Gewebekultur von Gerste kann abhängig von den Kulturbedingungen vorkommen, dass die Chromosomenanzahl der diploiden Zellen weiter verdoppelt wird, so dass Tetra- bzw. Oktaploide entstehen bzw. somaklonale Variationen oder andere abnorme Karyotypen (Choi *et al.* 2001) auftreten. Diese Veränderungen können bei den Pflanzen zu Wachstumsproblemen und mangelnder Fertilität führen.

Bei der durchflusszytometrischen Ploidiemessung (Übersicht: Dolezel und Bartos 2005) wird die Ploidie der Zellen durch den DNA-Gehalt der Zellkerne widerspiegelt (Naimski *et al.* 1980). Mit der verwendeten Methode können Rückschlüsse auf Vervielfachung des gesamten Chromosomensatzes gezogen werden, nicht jedoch auf die Veränderung einzelner Chromosomen (Dolezel und Bartos 2005).

Bekannt ist, dass auch aus Zygoten *in vitro* die Regeneration von Pflanzen, etwa Mais, möglich ist (Kranz und Lörz 1993). Die Regeneration von somatischen Geweben bei der Mikrosporenkultur ist auch bei anderen monokotylen Pflanzen wie der Narzisse (*Narcissus tazetta* L.) beschrieben worden (Chen *et al.* 2005). Somatische Embryogenese von Gerste ist, unter anderem bei ‚Golden Promise‘ und Igri (Chernobrovkina *et al.* 2004) möglich. Um die Regeneration von somatischen Geweberesten oder Zygoten zu vermeiden, ist bei der Isolierung der Mikrosporen ein Gradientenzentrifugationsschritt durchgeführt worden, der Mikrosporen spezifisch anreichert. Die Regeneration von Zygoten oder vegetativem Gewebe der Ähre würde nach der Regeneration ebenfalls diploide heterozygote Pflanzen hervorbringen.

Die Isolierungs- und Kulturbedingungen sind zwar für die Regeneration doppelhaploider Pflanzen aus Mikrosporen optimiert, die Regeneration anderer Gewebe wie etwa Zygoten (Kranz und Lörz 1993, Holm *et al.* 1994) oder vegetativem Gewebe der Mikrosporenmutterpflanzen ist jedoch im vorliegenden Fall nicht vollständig ausgeschlossen. Da die Isolierungsmethode speziell auf Mikrosporen ausgelegt wurde, ist sie jedoch sehr unwahrscheinlich. Die Qualität der Mikrosporen ist optisch mit einem Binokular und einer Zählkammer oder nach Anfärben mit FDA beim Vitalitätstest überprüft worden, so dass höchstens einzelne vegetative Zellen inmitten tausender Mikrosporen hätten vorliegen können. Da außerdem die Aufdopplung des haploiden Genoms durch Verschmelzung von haploiden Tochterkernen entsteht (Chen *et al.* 1977, Kasha *et al.* 2001b, Gonzalez-Melendi *et al.* 2005), ist nicht unwahrscheinlich, dass die Nachkommen weiterhin heterozygot sind. Die Auswahl der Ausgangspflanzen für die zu untersuchenden Linien ist auf Grundlage von Southern-Blot-Analysen der Regenerate erfolgt (3.2), so dass möglicherweise andere Individuen der Linien homozygot sind, was in Analysen der Folgegeneration festgestellt werden kann.

4.4 Spleißeffekte von *Ac* in Gerste

Auf welcher Ebene zwischen der Anzahl *Ac*-Elementkopien im Genom und der *Ac*-Transposaseaktivität die Regulation stattfindet, war zu Beginn der hier dargestellten Arbeiten weitgehend unklar. Daher sind Analysen der Transkripte durchgeführt worden (3.3), um zusammen mit den Daten über die *Ac*-Aktivität (3.4) Rückschlüsse zu ermöglichen.

Durch reverse Transkription, PCR mit spezifischen Primern und den Vergleich der amplifizierten Sequenz mit der einer *Ac*-Transposase-cDNA-Sequenz (Kunze *et al.* 1987) sowie der des *Ac*-Elements (Müller-Neumann *et al.* 1984, Pohlmann *et al.* 1984) sind unterschiedlich gespleißte *Ac*-Transposasetranskripte in den transgenen Gerstenlinien nachgewiesen worden.

Alle Pflanzen der *cwAc*-, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇- und *UbiAc*-Gerstenlinien haben korrekt gespleißte *Ac*-Transposase-Transkripte (3.3). Zusätzlich treten in Gerste und Mais verkürzte *Ac*-Transkriptfragmente auf, die kloniert und sequenziert worden sind (3.3.2). Die Intron-Exon-Übergänge im Konstrukt *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ entsprechen bis auf die 3'-Spleißstelle von Intron 3 alle den Konsensussequenzen von monokotylen Pflanzen (Simpson und Filipowicz 1996). Die Sequenzanalyse zeigt, dass zusätzliche Spleißstellen in den Exons 2 und 3 verwendet werden. Einige der zusätzlich verwendeten Spleißstellen in den Fragmenten sind entsprechend der

Vorhersage von Spleißstellen in der *cwAc₁₀₃₋₈₀₇*-Sequenz mit dem Programm *SplicePredictor* (Brendel und Kleffe 1998) ebenfalls gefunden worden (3.3.2).

Die Unterschiede im Dosisseffekt bei dikotylen im Vergleich zu monokotylen Pflanzen wurden bisher durch die Tatsache erklärt, dass die Introns monokotyler Pflanzen in dikotylen Pflanzen nur ineffizient gespleißt werden (Keith und Chua 1986). Diese These wurde dadurch unterstützt, dass bei *Arabidopsis thaliana* ein Fehlspleißen und alternatives Spleißen von *Ac*-Transkripten (Jarvis *et al.* 1997, Martin *et al.* 1997) auftritt. Es sind in *Arabidopsis thaliana* neben korrekt gespleißten auch ineffizient gespleißte Introns 3 und 4 (Jarvis *et al.* 1997), alternativ gespleißte Exons und in Exon 3 vorzeitig polyadenylierte *Ac*-Elemente (Martin *et al.* 1997) detektiert worden. Dieser Sachverhalt führt zu einer geringeren Menge korrekt prozessierter *Ac*-Transposase und dadurch scheinbar zu einer positiven Korrelation zwischen der *Ac*-Menge und der Aktivität.

Bei der Expression des Transposase-Gens aus dem monokotylen Mais in der ebenfalls monokotylen Gerste war zu erwarten, dass die Prä-mRNA korrekt prozessiert wird; es finden sich jedoch teilweise die gleichen Spleißvarianten wie in *Arabidopsis thaliana* (Jarvis *et al.* 1997, Martin *et al.* 1997) auch in Gerste und Mais (3.3), so dass die scheinbar unterschiedlichen Dosisseffekte in monokotylen und dikotylen Pflanzen vermutlich nicht direkt vom Spleißen des *Ac*-Transkripts verursacht werden.

Die Ergebnisse (3.3) legen nahe, dass die Menge des für die Translation verfügbaren *Ac*-Transposasetranskripts in Gerste und Mais durch alternatives Spleißen innerhalb der Exons 2 und 3 verringert wird. Bisher waren für Mais jedoch keine alternativ gespleißten *Ac*-Transkripte bekannt; aufgrund der Übereinstimmung in den Spleißprodukten kann jedoch vermutet werden, dass der gleiche Regulationsmechanismus wie in Mais auch in Gerste zugrunde liegt. In *PI-vv::Ac*-Mais findet auch zusätzliches Spleißen der *Ac*-Transkripte statt, jedoch in geringerem Maße als in Gerste (3.3).

Ob durch das alternative Spleißen der *Ac*-Transkripte die Menge der für die Translation verfügbaren Transkripte signifikant reduziert wird oder diese Transkripte möglicherweise zur Translation verkürzter Transposasemoleküle führen, ist noch zu klären.

Die Transkript-Fragmente (3.2.2) entstehen durch alternatives Spleißen und sind keine PCR-Artefakte, da sie mit den durch das Programm *SplicePredictor* (Brendel und Kleffe 1998) vorhergesagten potentiellen Spleißstellen übereinstimmen. Gegen eine Interpretation der Deletionsvarianten des *Ac*-Transkripts als durch Selbstannealing während der PCR zustande

gekommene unspezifische Reaktionsprodukte oder Produkte der Rekombination der homologen DNA-Sequenzen und *Template-Switching* während der Transkription spricht, dass ein Software-gestütztes Alignment von 100 bp-Fragmenten, die das ganze *Ac*-Element abdecken, kein Selbstannealing vorhersagt.

In vorherigen RT-PCR-Versuchen (Friedrich 2001) wurde bei den untersuchten Gerstenlinien *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#1*, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#2*, *cwAc#3* und *cwAc#4* bereits korrektes und alternatives Spleißen der Transposase-Prä-mRNA entdeckt (Friedrich 2001). In diesen vorherigen Untersuchungen wurden die Primer *Int2-F* und *Int4-R* (Jarvis *et al.* 1997) verwendet, die alle Introns des *cwAc₁₀₃₋₈₀₇*-Transposase-Gens, aber nicht alle Exons umfassen. Hier wurden zusätzlich die Primer *Int1-F* und *Int2-R* verwendet, die den analysierbaren Bereich um Exon 2 erweitern. So konnten in Exon 2 zusätzliche Spleißstellen entdeckt werden.

Die gegenüber der publizierten Sequenz des *Ac*-Elements (Müller-Neumann *et al.* 1984, Pohlmann *et al.* 1984, Kunze *et al.* 1987) bei der Sequenzierung festgestellten Einzelbasenabweichungen (3.3) treten nur in einzelnen Transkripten auf und lagen nicht an den Spleißstellen, sie sind daher als PCR- oder Sequenzierungsartefakte einzustufen.

Die alternativ gespleißten Transkripte enthalten ausschließlich Sequenzen der *Ac*-Transposase-cDNA (Kunze *et al.* 1987), sind also nicht durch Transkription von bei der Transformation umarrangierten *Ac*-Sequenzen entstanden.

Die Sequenzen der mit den Primern *Int1-F* und *Int2-R* amplifizierten Transkriptfragmente sind bis zu Position 1581 homolog zur Sequenz des *Ac*-Transposasegens. Intron 2 ist korrekt herausgespleißt. Bei Position 1584 des *Ac*-Elements befindet sich laut *SplicePredictor* (Brendel und Kleffe 1998) eine mögliche Donorspleißstelle. Bei allen Deletionsvarianten von Exon 2 wird diese Donorspleißstelle benutzt. Als Akzeptorspleißstellen werden laut Sequenzierungsergebnis die Positionen 2325, 2346, 2403 und 2481 genutzt. Es befindet sich jedoch nur bei Position 2405 eine mit dem *SplicePredictor* (Brendel und Kleffe 1998) vorhersagbare Akzeptorspleißstelle. Sie weicht leicht von der pflanzlichen Konsensussequenz ab (AG/GA) und wurde in keinem der sequenzierten Klone verwendet. Für die anderen drei Fragmente lässt sich keine der Konsensussequenz entsprechende Akzeptorstelle bestimmen. Alle Spleißvarianten in Exon 2 und alle in Exon 3 beginnen mit jeweils der gleichen Donorspleißstelle.

In den mit den Primern *Int2-F* und *Int4-R* amplifizierten Transkriptfragmenten ist die Sequenzhomologie bei Position 2736 des *Ac*-Elements unterbrochen. Dort befindet sich eine

vom *SplicePredictor* (Brendel und Kleffe 1998) identifizierte 5'-Donorspleißstelle. Sie weicht ebenfalls von der Konsensussequenz in monokotylen Pflanzen ab (TG/GT statt AG/GT).

Alle Introns sind unter Verwendung der auch theoretisch vorhergesagbaren starken Spleißstellen korrekt aus den zugrundeliegenden *Ac*-Transkripten exzisiert. Nur für die Klone, in denen die Sequenzidentität bei Position 3241 wiederaufgenommen wird, befindet sich an der Stelle eine vorhergesagte Akzeptorspleißstelle.

Alternativ gespleißte Transkripte sind auch in Mais kloniert und sequenziert worden (3.3.1). In Northern-Blot-Analysen beobachtete *Ac*-Transkriptfragmente waren bisher nicht weiter identifiziert worden (Kunze *et al.* 1987). Es ist in den vorliegenden Analysen in keiner der transgenen Gerstenlinien ungespleißtes Transkript detektiert worden.

Die RNA-Prozessierung ist, nicht nur bei höheren Pflanzen, ein komplexer und dynamischer Vorgang (Simpson und Filipowicz 1996). Insbesondere bei Pflanzen ist das Spleißen eine wichtige Regulationsebene für die Genexpression (Filipowicz *et al.* 1995).

Mehrere cis-aktive Sequenzelemente in Exons sowie Introns beeinflussen die Effizienz und Genauigkeit des Spleißens und können so die Form und Menge von mRNA beeinflussen. Alternatives Spleißen kann gewebe- oder entwicklungsabhängig sein (Simpson und Filipowicz 1996).

Bei Pflanzen hat der Spleißvorgang einige einzigartige Merkmale. Pflanzliche Gene haben kürzere Introns und längere Exons als tierische Gene. Das normale Spleißen verläuft bei Pflanzen mit geringer Effizienz, während tierische Zellen in der Regel keine Transkripte akkumulieren (Simpson und Filipowicz 1996). Es ist jedoch bekannt, dass die Expression von Transgenen durch fehlerhaftes Spleißen verhindert werden kann (Simpson und Filipowicz 1996). Alternativer Gebrauch von 5'-Spleißstellen, ‚Exonskipping‘ und alternative Polyadenylierung sind auch beim ZEMa-Gen (MADS-Box-Typ Transkriptionsfaktor aus Mais) bekannt (Montag *et al.* 1995). Die Exzision von Intron 1 des *waxy*-Gens in Reis kontrolliert den Amylosegehalt (Wang *et al.* 1995).

Pflanzen besitzen AU(=AT)-reiche Intronsequenzen, die für eine effiziente Prozessierung erforderlich sind. Im Gegensatz zu tierischen Organismen spleißen Pflanzen auch bei Hitze-Stress. Die Prä-mRNA-Prozessierung von monokotylen Pflanzen wie Mais (*Zea mays* L.) und dikotylen Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* weist einige Unterschiede auf (Simpson und Filipowicz 1996). Introns aus dikotylen Pflanzen und aus tierischen Organismen werden meist korrekt und effizient in monokotylen Pflanzen prozessiert (Goodall und Filipowicz 1991, Peterhans *et al.* 1990). Umgekehrt ist dies nicht immer der Fall. Ein vom *Ac*-Element

abgeleitetes Gene-Trap-Element wird in Tabak (*Nicotiana tabacum*) effizienter gespleißt als in *Arabidopsis thaliana* (Nussaume *et al.* 1995).

Transposons ähneln Introns, da sie auch AT-reich sind (Nash *et al.* 1990, Wessler 1991). Einige Introns stammen möglicherweise von transponierbaren Elementen ab (Weil und Wessler 1990, Purugganan 1993). Transponierbare Elemente werden oft aus Host-Genen herausgespleißt, was auf die hohe Toleranz beim Spleißen in Mais zurückgeführt wird; dabei werden kryptische Spleißstellen im Element oder dem Zielgen verwendet (Filipowicz *et al.* 1995). Manchmal geschieht dies gewebespezifisch (Varagona *et al.* 1992). Für das *Ds1*-Element ist sogar bekannt, dass es alternativ aus Exons herausgespleißt wird (Wessler 1991). Kryptisches Spleißen von transponierbaren Elementen führt zu veränderten Phänotypen bei Mais (Weil und Wessler 1990).

Das Mais-Transposon *En/Spm* generiert durch alternatives Spleißen zwei Transkripttypen *tnpA* und *tnpD* im Verhältnis 100:1. Bei Expression in *Arabidopsis thaliana* kann das gleiche Verhältnis beobachtet werden, während bei der Expression in Kartoffel (*Solanum tuberosum*) das *tnpD*-Transkript vorwiegt und weitere Transkriptvarianten auftreten (Cardon *et al.* 1993, Frey *et al.* 1989, Masson *et al.* 1989). Spleißregulation ist auch beim transponierbaren *P*-Element von *Drosophila melanogaster* bekannt (Laski *et al.* 1986).

Das *Ac*-Element produziert in Mais nur geringe Transkriptmengen von $2-13 \times 10^{-5}$ der mRNA (Schein *et al.* 1990, Fußwinkel *et al.* 1991); das entspricht 1-10 Transkripten pro Zelle. Die daraus translatierte *Ac*-Transposase ist mit nur ca. 1000 Transposase-Molekülen pro Zelle ein sehr seltenes Protein, was auf eine relativ geringe Translationseffizienz oder geringe Stabilität des Proteins hinweist (Fußwinkel *et al.* 1991).

Die vorhergesagte Größe der *Ac*-Transposase beträgt 92 kDa (Kunze *et al.* 1987). In der nativen oder denaturierenden Gelelektrophorese sowie nach Dephosphorylierung scheint das Molekulargewicht jedoch 112 kDa zu betragen (Fußwinkel *et al.* 1991). Zusätzlich wurde ein 70 kDa-Protein mit einem Antikörper gegen die *Ac*-Transposase detektiert, aber zunächst für ein Präparationsartefakt gehalten (Fußwinkel *et al.* 1991). Im Zusammenhang mit den hier dargestellten Ergebnissen kann das Protein möglicherweise auch eine Folge der Translation alternativ gespleißter *Ac*-Transkripte sein.

Vermutlich inhibiert das Translationsprodukt der alternativ gespleißten Transposasetranskripte die wt-Transposase und trägt dadurch zur Regulation bei. Es wurde bereits beobachtet, dass *Ds*-Elemente Transkriptfragmente produzieren, die zu den

entsprechenden Proteinfragmenten translatiert werden, deren einzelne Domänen dann mit dem *Ac*-Element wechselwirken und mit anderen *Ac*-Transposasemolekülen konkurrieren können (Kunze und Weil 2002).

Einige der Transkripte mit herausgespleißten Sequenzen würden zu Frameshifts führen. In Exon 2 alternativ gespleißte Transkripte ergäben nach der Translation eine Transposase ohne eine der Kernlokalisationssequenzen (Boehm *et al.* 1995) oder ohne Teile der DNA-Bindedomäne (Becker und Kunze 1997). Transkripten mit aus Exon 3 herausgespleißten Sequenzen würden RNA-destabilisierende Motive fehlen. Die in Exon 4 befindliche Dimerisierungsdomäne (Essers *et al.* 2000) wäre von den detektierten Deletionen nicht betroffen, möglicherweise jedoch andere für die Faltung der Gesamtstruktur wichtige Proteindomänen. Eine Vorhersage mit Strukturdatenbanken ergibt beispielsweise diverse Zinkfinger motive. Um hier weitere Informationen zu erhalten, müsste die Struktur der *Ac*-Transposase röntgenkristallographisch aufgeklärt werden.

Es konnte in den vorgelegten Untersuchungen nur eine semiquantitative Analyse der Transkriptprozessierung durchgeführt werden, da bei geringen cDNA-Mengen die Einstellung der PCR-Ansätze auf gleiche cDNA-Mengen nicht erfolgreich war. Die Methode kann nicht als quantitativ exakt gelten, da aufgrund der exponentiellen Amplifikation auch Fehler schnell sehr großen Einfluss auf die Messung haben und bei PCR-Reaktionen nach einer großen Anzahl Zyklen eine Sättigung der Reaktionsprodukte eintreten kann, die darauf beruht, dass nicht mehr ausreichend Nukleotide zur Verfügung stehen bzw. die Polymerase durch wiederholtes Erhitzen inaktiviert wird.

Es kann also weder exakt auf Mengenverhältnisse der Transkripte geschlossen werden, noch eine Unterscheidung von doppelhaploiden und nichtdoppelhaploiden Pflanzen getroffen werden.

Eine quantitative Real-Time-RT-PCR (Bustin 2000) kann zwar interessante Information über die relative Häufigkeit von Transkripten liefern, jedoch unterscheiden sich die hier untersuchten Transkripte zu wenig von einander, so dass keine Primer entworfen werden können, die ausschließlich eines der Fragmente amplifizieren. Denkbar wäre jedoch die Anpassung und Verwendung quantitativer Sequenziermethoden, wie etwa das Sequenzieren mit fluoreszenzmarkierten Primern (Pannetier *et al.* 1993, Marone *et al.* 2001, Wilkening *et al.* 2005).

4.5 Methodische Vorteile und Grenzen des ‚*Transposon Tagging*‘-Ansatzes

Die vorliegende Arbeit schafft durch die Charakterisierung von *cwAc*-, *cwAc₁₀₃₋₈₀₇*- und *UbiAc*-Linien die Möglichkeit, bei der Etablierung eines Zwei-Komponenten-Systems in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gezielt Pflanzen einzusetzen, die besonders dafür geeignet sind. Alle auf Eignung getesteten Linien exprimieren eine in Gerste funktionsfähige *Ac*-Transposase. Einer der Vorteile des ‚*Transposon-Tagging*‘ ist die direkte Kopplung der entstehenden Knockout-Mutanten an die bekannte Sequenz des transponierbaren Elements. Das *Tagging* mit *Ac* in heterologen Systemen erleichtert die Analyse weiter, da keine Interferenz mit von arteigenen transponierbaren Elementen hervorgerufenen Mutationen auftreten.

Der Einsatz von Pflanzen mit mobilisierbaren *Ds*-Elementen und einer Pflanze mit einer optimalen *Ac*-Transposasequelle bildet die Basis für die Erstellung einer ‚*Transposon-Tagging*‘-Population in Gerste. Als Aktivitätsoptimum für ein *Tagging*-System sollte ein Transpositionsereignis pro Pflanze in einem möglichst frühen Stadium der Pflanzenentwicklung gelten.

Besonders geeignet für *Tagging*-Experimente ist die Linie *DHcwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a*, da sie in semitransienten Tests gehäuft GUS-Signale, also die höchste *Ac*-Transposaseaktivität (3.4) aufweist und zudem homozygot für das *Ac*-Element ist. Da Hinweise auf die Methylierung von *Ac*-Kopien in den *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#7*-Sublinien aufgetreten sind (3.2), besteht vermutlich die Gefahr eines Aktivitätsverlustes der Linie *cwAc₁₀₃₋₈₀₇#73a* in späteren Generationen.

Die Aktivität der *Ac*-Transposase ist durch Exzision von *mDs* aus den transient ins Skutellum von *Ac*, *Ac₁₀₃₋₈₀₇*- und *UbiAc*-Pflanzen eingebrachten *mDs*-Konstrukten *Act/mDs/GUS*- und *pUbi::mDs::GUS* überprüft worden (modifiziert nach McElroy *et al.* 1997). Die Aktivität der *Ac*-Transposase ist indirekt durch histochemische Detektion der nach Exzision des mobilen nicht-autonomen Elements *mDs* aus den Testvektoren auftretenden GUS-Expression überprüft worden.

Für die GUS-Expression durch die Testkonstrukte *pAct/mDs/GUS* und *pUbi::mDs::GUS* sind die *Actin1*- (McElroy *et al.* 1990, McElroy *et al.* 1991) und *Ubiquitin1*-Promotoren (Christensen *et al.* 1992) verwendet worden. Da zunächst angenommen wurde, dass die Klonierung von *mDs* hinter den *Actin1*-Promotor ins erste Exon des *Actin1*-Gens in einigen Fällen zu Verschiebungen im Leserahmen und so zu veränderten Genprodukten führen

könnte, ist *mDs* auch in die Linkersequenz eines *Ubiquitin1*-Reporterkonstrukts hineinkloniert worden (3.4.1). Das resultierende Testkonstrukt lieferte dennoch nicht in allen Linien die erwartete Erhöhung der messbaren Aktivität. Möglicherweise spielen hier Wechselwirkungen der *Actin1*- und *Ubiquitin1*-Promotoren mit dem *uidA*-Gen oder mit anderen zellulären Prozessen eine Rolle. Das Skutellum ist ein Gewebe, in dem nicht nur Zellteilung und Aufbau stattfindet, sondern auch der Umbau und Abbau von Zellen bzw. Apoptose stattfinden.

Ubiquitin dient der Markierung von Proteinen, die in der Zelle zum Abbau bestimmt werden, der *Ubiquitin*-Promotor wird also stärker exprimiert, wenn in Zellen natürliche Abbauprozesse stattfinden, oder unter dem Einfluss von Stress, während Actin für den Aufbau des Zytoskeletts eine wichtige Rolle spielt und der *Actin*-Promotor exprimiert wird, wenn die Zelle wächst und sich teilt. Vermutlich wird also die Aktivität von *Ac* und der Reporterkonstrukte im Skutellum durch zusätzliche Faktoren beeinflusst, die sich von Zelle zu Zelle unterscheiden können, je nach physiologischem Status bzw. danach, ob sie sich im Auf- oder Abbau befindet. Außerdem korreliert Methylierung im *Ubiquitin1*-Promotor-Komplex mit Transgeninaktivierung in Gerste (Meng *et al.* 2003), so dass die Expression im Testsystem eventuell durch die Gewebekultur selbst beeinflusst wird.

Vorherige Versuche mit dem semitransienten Testsystem zeigten, dass die Anzahl detektierter GUS-Signale bei transienten Transformationsereignissen nach ca. 48 Stunden höher ist als nach etwa einer Woche (Friedrich 2001).

Tests über den Verlauf der Anthocyan- und GUS-Expression in Korrelation mit dem Entwicklungsstand, gemessen am Durchmesser des Skutellums, haben ergeben, dass es zwei Expressionsoptima gibt (3.4.1). Es sind für die indirekte *Ac*-Aktivitätsmessung auch Proben ausgewertet worden, deren Durchmesser jenseits dieser Optima liegen. Da es innerhalb der Ähren einen Entwicklungsgradienten gibt, ist es trotz kontrollierter Gewächshausbedingungen nicht möglich, das Pflanzenmaterial für die Gewebeproben so einheitlich zu ernten, dass das Skutellum immer im gleichen Entwicklungsstadium vorliegt. Um die Versuche dennoch zu standardisieren, sollte ein Korrekturfaktor verwendet werden, der das Verhältnis von GUS-Signalen zu Anthocyanensignalen in Abhängigkeit vom Skutellumdurchmesser berücksichtigt.

Das Verhältnis von GUS- zu Anthocyan-Expression verschlechtert sich im Laufe der Entwicklung des Skutellums teilweise, während es bei anderen Versuchen konstant bleibt (3.4.1). Möglicherweise spielt die biochemische Aktivität des Gewebes bei der erfolgreichen Expression von fremder DNA und für die Fähigkeit zur Regeneration von vitalen Pflanzen

eine Rolle. Für eine stabile Transformation von Gerste wird Skutellumgewebe mit einem Durchmesser von ca. zwei Millimetern bevorzugt (Wan und Lemaux 1994, Lemaux *et al.* 1996). Vermutlich ist das Skutellumgewebe in diesem Entwicklungsstadium besonders vital. Daher ist angenommen worden, dass dieses Entwicklungsstadium auch ein günstiges Stadium für die Expression von Reporterkonstrukten ist. Der Korrekturfaktor ist also auf das Aktivitätsoptimum bei einem Skutellumdurchmesser von zwei Millimetern bezogen worden.

Der Vorteil eines transienten oder semitransienten Testsystems für ein ‚*Transposon-Tagging*‘-System liegt darin, dass mit relativ geringem Zeitaufwand grundsätzliche Informationen über das Aktivitätsniveau der Linien gewonnen werden kann. Semitransiente Tests ermöglichen eine schnelle Einschätzung der Funktionsfähigkeit der beiden Komponenten in einem Zwei-Komponenten-System (McElroy *et al.* 1997). Die Grenzen und Nachteile des Testsystems bestehen darin, dass es bisher nur für Skutellum, also nur eines der möglichen Gewebe bei Gerste etabliert ist. Zudem ist das Skutellum ein Gewebe, das erst sehr spät in der Entwicklung der Pflanze, nämlich nach der Befruchtung entsteht. Die Ergebnisse von ‚*in vitro*‘-Testsystemen können von Infektionen durch Pilze und Bakterien, die das Gewebe schädigen, Stressreaktionen hervorrufen und selbst GUS-Aktivität aufweisen können, verfälscht werden. Das Testsystem zeigt auch unabhängig von beeinflussenden Faktoren eine hohe Variabilität, die jedoch auch der Variabilität *in vivo* entspricht (McElroy *et al.* 1997, Lazarow 2006).

Die *TILLING* (‚*Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*‘)-Methode stellt eine Alternative zum ‚*Transposon-Tagging*‘ dar (McCallum *et al.* 2000, Colbert *et al.* 2001). Beim *TILLING* werden durch chemische Mutagenese (Alkylierung mit Methansulfonsäureethylester) Punktmutationen im Genom erzeugt. Die DNA wird daraufhin isoliert, gepoolt, per PCR amplifiziert und mittels danturierender HPLC aufgetrennt. So können Basenfehlpaarungen detektiert werden. Mit der voranschreitenden Sequenzierung der Genome vieler Organismen gewinnen solche ‚*Reverse Genetics*‘-Strategien an Bedeutung. *TILLING* braucht nicht für jeden Organismus neu etabliert zu werden und funktioniert ohne das Einbringen fremder DNA-Sequenzen in den Organismus. Die mittels *TILLING* hergestellten ‚*Knock-out*‘-Mutanten können durch mehrere Mutationen im gleichen Gen verifiziert werden. Die Methode ist automatisierbar und liefert bei Populationen von nur etwa 10000 Pflanzen bereits einen hohen Durchsatz. Trotz der Kostenintensivität der Methode ist sie laut ihren Entwicklern bereits finanziell günstiger als die Kombination aus Genomsequenzierung und *Micro-Array*-Technologie.

4.6 Ausblick

In Gerste ist bisher nur das Retrotransposon BARE-1 (Manninen und Schulmann 1993) charakterisiert worden. Mit der Sonde *Ac5/6* (2.1.7) wurden bei Gerste des Kultivars ‚*Golden Promise*‘ mehrmals unspezifische Hybridisierungssignale beobachtet. Die Sonde bindet an Sequenzen des Exons 2 der *Ac*-Transposase-Gensequenz. Es ist nicht auszuschließen, dass Gerste eigene Transposons enthält, da bisher bei jedem danach untersuchtem Organismus welche gefunden wurden. Ein Untersuchungsansatz zum Auffinden von weiteren Transposons in Gerste wäre das ‚*Screening*‘ einer genomischen Bibliothek von Gerste mit auf bekannten Transposonsequenzen basierenden Sonden.

Aufbauend auf den hier vorgelegten Ergebnissen wird die nähere Untersuchung der *Ac*-Spleißvarianten in Mais (*Zea mays* L.), eventuell mittels Realtime-PCR, interessant. Zur Untersuchung der Transkription könnten chemische Inhibitoren der Transkription wie Rifampicin, α -Amanitin, Cordycepin oder Actinomycin D verwendet werden.

Eine weitere Optimierung der Northern-Blot-Analysen mit DIG-markierten Sonden in Mais und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) sind dafür Voraussetzung. Weitere Regulationsebenen für die Aktivität von *Ac* wären Translation oder posttranslationale Modifikation.

Außerdem sind die Wechselwirkungen der *Ac*-Transposase mit anderen Faktoren und ihre Wechselwirkungen mit anderen *Ac*-Transposasemolekülen, etwa die Bildung von Aggregaten bei Überexpression in Petunien (*Petunia hybrida*, Kunze *et al.* 1993) und Mais (Heinlein *et al.* 1994) wichtig. Wechselwirkungen des *Ac*-Transposase-Proteins mit gersteigenen ‚*Host*‘-Faktoren können beispielsweise durch DNA-Bindungs-Assays oder mit Hilfe von Hefe-Zwei-Hybrid-Testsystemen untersucht werden.

Um die Bildung von *Ac*-Transposase-Aggregaten auf Proteinebene zu verstehen, ist eine röntgenkristallographische Aufklärung der *Ac*-Transposase-Proteinstruktur mit und ohne Bindungspartner erforderlich.

Außerdem existiert im *Ac*-Element ein überlappender kurzer offener Leserahmen von 304 Basenpaaren, der als Regulationsfaktor postuliert wurde (Kunze *et al.* 1987), seine Transkription und Translation konnten jedoch bisher nicht bestätigt werden.

In der Praxis wird die Ausweitung von semitransienten Tests auf den Ursprungsorganismus Mais von Bedeutung sein, um die Aktivität von Linien zu bestimmen und so den Dosisseffekt genauer zu verstehen.

Die bereits charakterisierten Gerstenlinien stehen zur Verwendung beim Aufbau einer ‚*Transposon Tagging*‘-Population bereit.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hat die Aktivität von *Ac*-Transposase aus Mais (*Zea mays* L.) im heterologen System Gerste (*Hordeum vulgare* L.) im Rahmen der Etablierung eines ‚*Transposon-Tagging*‘-Systems zur Insertionsmutagenese analysiert und charakterisiert.

Transponierbare Elemente sind bewegliche funktionelle Einheiten des Genoms. Für die Transposition brauchen transponierbare Elemente eine *trans*-aktive Transposase sowie *cis*-determinante ‚*Terminal Inverted Repeats*‘ (*TIR*) und subterminale Sequenzmotive. Während der Transposition interagiert die Transposase mit den *cis*-Determinanten des transponierbaren Elements. Der teilweise Verlust der *cis*-Determinanten führt zur Immobilisierung des Elements (Healy *et al.* 1993).

Als Ausgangsmaterial sind Gerstenlinien verwendet worden, die mittels Partikelbeschuss mit den immobilisierten transponierbaren Elementen *cwAc*, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ und *UbiAc* transformiert worden waren.

Die Elemente *cwAc* und *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ sind durch Deletion der ersten fünf Basen der 5'-*TIR* von *Ac* abgeleitet. Das Element *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ enthält zusätzlich gegenüber dem *Ac*-Wildtyp-Element eine Deletion von 412 Basenpaaren im 5'-*UTL* (Kunze *et al.* 1995) und exprimiert eine N-terminal um 102 Aminosäuren verkürzte Transposase. Das *UbiAc*-Konstrukt (Koprek *et al.* 1999) exprimiert die *Ac*-Transposase unter der Kontrolle des *Ubiquitin1*-Promotors (Christensen *et al.* 1992).

Neben der Untersuchung auf Diploidität (3.1), vollständige Integration und Kopienanzahl der Transformationskonstrukte (3.2) ist die Expression, insbesondere die Prozessierung von *Ac*-Transkripten (3.3) und die *Ac*-Transposase-Aktivität (3.4), in stabil transformierten (3.1) Gerstenlinien untersucht worden. Für die Expression funktionsfähiger *Ac*-Transposase ist notwendig, dass der Genort das intakte Gen einschließlich eines Promotors und des Polyadenylierungssignals enthält.

Die per Mikrosporenkultur doppelhaploidisierten Gerstenlinien sind mittels Durchflusszytometrie, PCR und Southern-Blot über mehrere Generationen analysiert und die Vererbung des *Ac*-Elements ist beobachtet worden. Alle Linien sind diploid und enthalten mindestens ein vollständiges immobilisiertes *Ac*-Element. Bei einigen Linien tritt jedoch Segregation der *Ac*-Elemente auf, was darauf hinweist, dass die Doppelhaploidisierung nicht bei allen Linien erfolgreich gewesen ist.

Ac-Transkripte sind aus den Gerstenlinien *cwAc*, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ und *UbiAc* sowie der Maislinie *PI-vv::Ac* per RT-PCR isoliert, kloniert und sequenziert worden. Alle untersuchten

Gerstenpflanzen produzieren korrekt gespleißte *Ac*-Transkripte und alternativ gespleißte Transkripte, die zusätzlich herausgespleißte Sequenzen in Exon 2 und 3 aufweisen. Die herausgespleißten Sequenzen beginnen jeweils mit der gleichen Donorspleißstelle bei Position 1581 bzw. 2729 und enden in unterschiedlichen Akzeptorspleißstellen. Solche alternativen Transkripte sind auch aus dikotylen Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* bekannt (Jarvis *et al.* 1997, Martin *et al.* 1997). Auch in Mais treten alternativ gespleißte Transkripte auf. Vermutlich reduziert das alternative Spleißen die Menge der zur Verfügung stehenden funktionellen *Ac*-Transposasemoleküle in der Zelle.

In einem eigens dafür entwickelten semi-transienten Testsystem mit dem Plasmid p*Ubi::mDs::GUS* sind in Gerstenskutellum-Gewebe variable Transposase-Aktivitäten *in vitro* nachgewiesen worden. Die Aktivität von *Ac* nimmt in Gerste bis zu sechs *Ac*-Kopien mit steigender Dosis zu und bei einer höheren Anzahl *Ac*-Elemente wieder ab.

In homozygoten und heterozygoten Pflanzen einer Linie, die bis zu vier unabhängige *Ac*-Elementkopien enthält, kann beobachtet werden, dass in Gerste die *Ac*-Aktivität bei bis zu sechs *Ac*-Elementen im Genom zunimmt. Bei mehr *Ac*-Elementen nimmt die Aktivität wieder ab. Möglicherweise ist die Ursache für die Autosuppression jedoch nicht das alternative Spleißen, da dieses außer in Gerste und *Arabidopsis thaliana* (Jarvis *et al.* 1997, Martin *et al.* 1997) auch im Ursprungsorganismus Mais auftritt, sondern die Bildung von *Ac*-Transposase-Aggregaten.

Weder der verwendete Promotor noch die Deletion des 5'-*UTL* und der ersten 102 Aminosäuren haben einen direkten Einfluss auf die Aktivität von *Ac* in Gerste. Die genetische Umgebung der einzelnen *Ac*-Loci beeinflusst die Expression und Aktivität von *Ac*, wie durch Linien mit mehreren unterschiedlich aktiven Loci gezeigt worden ist.

Es sind mehrere Linien mit hoher *Ac*-Aktivität bestimmt worden, die bereits für Kreuzungsversuche verwendet wurden (Lazarow 2006). Das ‚*Transposon-Tagging*‘-System ist damit etabliert und einsatzbereit.

Summary

The purpose of this work is to analyse and characterize the activity of the *Ac*-transposase from maize (*Zea mays* L.) in the heterologous organism barley (*Hordeum vulgare* L.) in order to establish a *Transposon-Tagging* system for insertional mutagenesis in barley.

Transposable elements are mobile functional units of the genome. Transposons require the *trans*-activating protein transposase and *cis*-determinant 'Terminal Inverted Repeats' (*TIR*) as well as subterminal sequence motives for transposition. During transposition the transposase interacts with the *cis*-determining sequences. The partial deletion of *cis*-determining sequences leads to immobilisation of the transposable element (Healy *et al.* 1993).

Barley lines transformed with the immobilised elements *cwAc*, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ and *UbiAc* via particle bombardment have been analysed. The elements *cwAc* and *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ are derived from *Ac* by deletion of the first five bases of the 5'-*TIR*. 412 basepairs have been additionally deleted in the 5'-leader sequence of the element *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇. The element *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ codes for a truncated transposase lacking 102 aminoacids at the N-terminus. The *UbiAc*-construct (Koprek *et al.* 1999) contains the *Ac*-transposase under the control of the *Ubiquitin1*-promoter (Christensen *et al.* 1992).

The transgenic lines have been tested for diploidy of their genomes (3.1), complete integration and number of inserted constructs (3.2), as well as the expression of the transposase. Attention was focused on the processing of transcripts (3.3) and the *Ac*-transposase-activity (3.4) in stably transformed barley lines. Loci containing an intact transposase-gene including a promoter and a poly adenylation site are vital for the expression of functional *Ac*-transposase.

Homozygous barley lines have been generated via microspore culture and analysed by flow-cytometry, PCR and Southern-blotting over several generations. All barley lines are diploid and contain at least one complete immobilised *Ac*-element. Segregation of the transgene is detected in some lines, suggesting that not all lines are double-haploid.

Ac-transcripts have been isolated via RT-PCR and sequenced from the barley lines *cwAc*, *cwAc*₁₀₃₋₈₀₇ and *UbiAc* as well as the maize line *PI-vv::Ac*. All lines produce correctly spliced *Ac*-transcripts and additionally alternatively spliced transcripts lacking sequences in exons 2 and 3. The deleted sequences begin at the same splice donor site at position 1581 or 2729 and end at different acceptor sites. Similar alternative transcripts have been previously isolated from the dicotyledoneous *Arabidopsis thaliana* (Jarvis *et al.* 1997, Martin *et al.* 1997).

Alternatively spliced transcripts can also be isolated from maize. Alternative splicing probably reduces the amount of available and functional *Ac*-transposase in the cell.

Variable transposase-activity has been demonstrated *in vitro* with a specially designed semi-transient test with the plasmid *pUbi::mDs::GUS*. The activity of *Ac* in barley increases with *Ac*-dosage. In the analysed lines an activity maximum was reached with six *Ac*-copies in the barley genome. Homo- and heterozygous individuals of one line containing up to four independent *Ac*-elements show that the activity of *Ac* increases with the number of *Ac*-copies. Probably the cause for the auto-suppression of *Ac* is not the alternative splicing, as it also occurs in *Arabidopsis thaliana* (Jarvis *et al.* 1997, Martin *et al.* 1997), but the aggregation of the transposase-protein in the cell.

Neither the usage of the *Ubiquitin1*-promoter for expression of *Ac* nor the deletion of the first 102 aminoacids seem to have a direct effect on the activity of *Ac* in barley. The genetic environment of the different *Ac*-loci influences the expression and activity of *Ac*, as shown by lines with several independent loci.

Several lines with high *Ac*-activity have been identified and are already being used for breeding-experiments (Lazarow 2006). Hereby the *Ac*-based *Transposon-Tagging* system for barley has been successfully established.

Literaturverzeichnis

- Athma P, Peterson T: *Ac* induces homologous recombination at the maize *P* locus. *Genetics* **128**: 163-173 (1991).
- Baker B, Schell J, Lörz H, Fedoroff NV: Transposition of the maize controlling element 'Activator' in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **83**: 4844-4848 (1986).
- Becker D, Lutticke R, Li M, Starlinger P: Control of excision frequency of maize transposable element *Ds* in *Petunia* protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **89**: 5552-5556 (1992).
- Becker D, Brettschneider R, Lörz H: Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *The Plant Journal* **5**: 299-307 (1994).
- Becker HA, Kunze R: Maize *Activator* transposase has a bipartite DNA binding domain that recognizes subterminal sequences and the terminal inverted repeats. *Molecular and General Genetics* **254**: 219-230 (1997).
- Belzile F, Yoder JI: Pattern of somatic transposition in a high copy *Ac* tomato line. *The Plant Journal* **2**: 173-179 (1992).
- Bergmann C: Entwicklung eines Gene-Trap Systems für monokotyle Pflanzen und Untersuchungen zu seiner Funktion in Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation, Universität Hamburg (2003).
- Bergmann C, Lütticke S: Analysis of splice donor and acceptor function in a novel *Ac*-based gene trap construct. *Planta* **219**: 876-883 (2004).
- Bird A: DNA Methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development* **16**: 6-21 (2002).
- Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-1523 (1979).
- Block M: Isolierung, Charakterisierung und Expressionsanalysen von Stärkesynthase-Genen aus Weizen (*Triticum aestivum* L.). Dissertation, Universität Hamburg (1997).
- Boehm U, Heinlein M, Behrens U, Kunze R: One of three nuclear localization signals of maize *Activator (Ac)* transposase overlaps the DNA-binding domain. *The Plant Journal* **7**: 441-451 (1995).
- Bravo-Angel AM, Becker HA, Kunze R, Hohn B, Shen WH: The binding motifs for *Ac* transposase are absolutely required for excision of *Ds1* in maize. *Molecular and General Genetics* **248**: 527-534 (1995).

-
- Brendel V, Kleffe J: Prediction of locally optimal splice sites in plant pre-mRNA with applications to gene identification in *Arabidopsis thaliana* genomic DNA. *Nucleic Acids Research* **26**: 4748-4757 (1998).
- Brettell RI, Dennis ES: Reactivation of a silent *Ac* following tissue culture is associated with heritable alterations in its methylation pattern. *Molecular and General Genetics* **229**: 365-372 (1991).
- Brinkmann H, Martinez P, Quigley F, Martin W, Cerff R: Endosymbiotic origin and codon bias of the nuclear gene for chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from maize. *Journal of Molecular Evolution* **26**: 320-328 (1987).
- Brutnell TP, May BP, Dellaporta SL: The *Ac-st2* element of maize exhibits a positive dosage effect and epigenetic regulation. *Genetics* **147**: 823-34 (1997).
- Budar F, Thia-Toong L, Van Montagu M, Hernalsteens JP: *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer Results Mainly in Transgenic Plants Transmitting T-DNA as a Single Mendelian Factor. *Genetics* **114**: 303-313 (1986).
- Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**: 169-193 (2000).
- Cardon GH, Frey M, Saedler H, Gierl A: Mobility of the maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **3**: 773 (1993).
- Carle-Urioste JC, Ko CH, Benito M-I, Walbot V: In vivo analysis of intron processing using splicing-dependent reporter gene assays. *Plant Molecular Biology* **26**: 1785-1795 (1994).
- Chatterjee S, Starlinger P: The role of subterminal sites of transposable element *Ds* of *Zea mays* in excision. *Molecular and General Genetics* **249**: 281-288 (1995).
- Chen CC: In vitro development of plants from microspores of rice. *In Vitro* **13**: 484-489 (1977).
- Chen J, Greenblatt IM, Dellaporta SL: Transposition of *Ac* from the *P* locus of maize into unreplicated chromosomal sites. *Genetics* **117**: 109-116 (1987).
- Chen L, Zhu X, Gu L, Wu J: Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem). *Plant Cell Reports* (2005).

-
- Chernobrovkina MA, Karavaev CA, Kharchenko PN, Melik-Sarkisov OS: Somatic Embryogenesis and Morphogenetic Potential of Spring Barley (*Hordeum vulgare* L.) in the System of Technological Genetic Transformation. *Biology Bulletin* **31**: 332-336 (2004).
- Choi H-W, Lemaux PG, Cho M-J: Selection and osmotic treatment exacerbate cytological aberrations in transformed barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Plant Physiology* **158**: 935-943 (2001).
- Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**: 156-159 (1987).
- Chomet PS, Wessler S, Dellaporta SL: Inactivation of the maize transposable element *Activator (Ac)* is associated with its DNA modification. *The EMBO Journal* **6**: 295-302 (1987).
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH: Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* **18**: 675-689 (1992).
- Coen ES, Carpenter R, Martin C: Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*. *Cell* **47**: 285-296 (1986).
- Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S: High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiology* **126**: 480-484 (2001).
- Coupland G, Baker B, Schell J, Starlinger P: Characterization of the maize transposable element *Ac* by internal deletions. *The EMBO Journal* **7**: 3653-3659 (1988).
- Dennis ES, Brettell RI: DNA methylation of maize transposable elements is correlated with activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* **326**: 217-229 (1990).
- Dolezel J, Bartos J: Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* **95**: 99-110 (2005).
- Dooner HK, English J, Ralston EJ, Weck E: A single genetic unit specifies two transposition functions in the maize element *Activator*. *Science* **234**: 210-211 (1986).
- Dooner HK, Belachew A, Burgess D, Harding S, Ralston M, Ralston E: Distribution of unlinked receptor sites for transposed *Ac* elements from the *bz-m2(Ac)* allele in maize. *Genetics* **136**: 261-279 (1994).

-
- Earp JD, Lowe B, Baker B: Amplification of genomic sequences flanking transposable elements in host and heterologous plants: a tool for transposon tagging and genome characterization. *Nucleic Acids Research* **18**: 3271-3279 (1990).
- Emerson RA: Genetical studies of variegated pericarp in maize. *Genetics* **2**: 1-35 (1917).
- Essers L, Adolphs RH, Kunze R: A Highly Conserved Domain of the Maize *Activator* Transposase is Involved in Dimerization. *The Plant Cell* **12**: 211-223 (2000).
- Fedoroff N: Maize transposable elements. In: Berg DE, Howe MM Hrsg. *Mobile Elements*. Washington DC, American Society for Microbiology 374-411 (1989).
- Fedoroff N, Wessler S, Shure M: Isolation of the transposable maize controlling elements *Ac* and *Ds*. *Cell* **35**: 235-242 (1983).
- Filipowicz W, Gniadkowski M, Klahre U, Liu H-X: Pre-mRNA splicing in plants. In: Labond Hrsg. *Pre-mRNA Processing*. Landes Publishers, Georgetown 65-78 (1995).
- Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES: DNA Methylation in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 223-247 (1998).
- Finnegan EJ, Kovac KA: Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology* **43**: 189-201 (2000).
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES: DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics and Development* **10**: 217-223 (2000).
- Frey M., Tavantzis S. M., Saedler H: The maize *En-1/Spm* element transposes in potato. *Molecular and General Genetics* **217**: 172-177 (1989).
- Frey M, Stettner C, Gierl A: A general method for gene isolation in tagging approaches: amplification of insertion mutagenised sites (AIMS). *The Plant Journal* **13**: 717-721 (1998).
- Fridlender M, Harrison K, Jones JDG, Levy AA: Repression of the *Ac*-transposase gene promoter by *Ac* transposase. *The Plant Journal* **9**: 911-917 (1996).
- Fridlender M, Sitrit Y, Shaul O, Gileadi O, Levy AA: Analysis of the *Ac* promoter: structure and regulation. *Molecular and General Genetics* **258**: 306-314 (1998).
- Friedrich C: Detaillierte molekulare Analyse der Komponenten cwAcDelta102 und mDs eines Zwei-Komponenten-Tagging-Systems in transgener Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Diplomarbeit, Universität Hamburg (2001).

-
- Fu X, Duc LT, Fontana S, Bong BB, Tinjuangjun P, Sudhakar D, Twyman RM, Christou P, Kohli A: Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research* **9**: 11-19 (2000).
- Fußwinkel H, Schein S, Courage U, Starlinger P, Kunze R: Detection and abundance of mRNA and protein encoded by transposable element *Activator (Ac)* in maize. *Molecular and General Genetics* **225**: 186-92 (1991).
- Gaul H, Mix G, Foroughi-Wehr B, Okamoto M: Pollen Grain Development of *Hordeum vulgare* L.. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* **76**: 77-80 (1976).
- Gisler B, Salomon S, Puchta H: The role of double-strand break-induced allelic homologous recombination in somatic plant cells. *The Plant Journal* **32**: 277-284 (2002).
- Gonzalez-Melendi P, Ramirez C, Testillano PS, Kumlehn J, Risueno MC: Three dimensional confocal and electron microscopy imaging define the dynamics and mechanisms of diploidisation at early stages of barley microspore-derived embryogenesis. *Planta* **222**: 47-57 (2005).
- Goodall GJ, Filipowicz W: Different effects of intron nucleotide composition and secondary structure on pre-mRNA splicing in monocot and dicot plants. *The EMBO Journal* **10**: 2635-2644 (1991).
- Goto D, Fujii S, Kaneko T, Furumoto T, Sugawara T, Tarikuz Zaman AK, Imagawa S, Dong J, Nakai Y, Mishima T, Sobel BE, Kitabatake A: Intracellular signal transduction modulating expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes. *Biochemical Pharmacology* **65**: 1907-1914 (2003).
- Greco R, Ouwerkerk PBF, Taal AJC, Favalli C, Beguiristain T, Puigdomènech P, Colombo L, Hoge JHC, Pereira A: Early and multiple *Ac* transpositions in rice suitable for efficient insertional mutagenesis. *Plant Molecular Biology* **46**: 215-227 (2001).
- Green CE, Armstrong CL, Anderson PC: Somatic cell genetic systems in corn. In: Downey K, Voellmy RW, Ahmad F, Schultz J Hrsg. *Advances in gene technology: molecular genetics of plants and animals*. Academic Press, New York: 147-157 (1983).
- Grevelding C, Becker D, Kunze R, von Menges A, Fantes V, Schell J, Masterson R: High rates of *Ac/Ds* germinal transposition in *Arabidopsis* suitable for gene isolation by insertional mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **89**: 6085-6089 (1992).
- Grigg G, Clark S: Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *Bioessays* **16**: 431-436 (1994).

-
- Haring MA, Gao J, Volbeda T, Rommens CM, Nijkamp HJ, Hille J: A comparative study of *Tam3* and *Ac* transposition in transgenic tobacco and petunia plants. *Plant Molecular Biology* **13**: 189-201 (1989).
- Healy J, Corr C, DeYoung J, Baker B: Linked and unlinked transposition of a genetically marked *Dissociation* element in transgenic tomato. *Genetics* **134**: 571-584 (1993).
- Hehl R, Baker B: Induced transposition of *Ds* by a stable *Ac* in crosses of transgenic tobacco plants. *Molecular and General Genetics* **217**: 53-59 (1989).
- Hehl R, Baker B: Properties of the maize transposable element *Activator* in transgenic tobacco plants: a versatile inter-species genetic tool. *The Plant Cell* **2**: 709-721 (1990).
- Heinlein M, Starlinger P: Variegation patterns caused by transposable element *Ac*. *Maydica* **36**: 309-316 (1991).
- Heinlein M, Brattig T, Kunze R: In vivo aggregation of maize *Activator* (*Ac*) transposase in nuclei of maize endosperm and Petunia protoplasts. *The Plant Journal* **5**: 705-714 (1994).
- Heinlein M: Excision patterns of *Activator* (*Ac*) and *Dissociation* (*Ds*) elements in *Zea mays* L.: implications for the regulation of transposition. *Genetics* **144**: 1851-1869 (1996).
- Hershberger R. J., Benito M. I., Hardeman K. J., Warren C., Chandler V. L., Walbot V: Characterization of the Major Transcripts Encoded by the Regulatory *MuDR* Transposable Element of Maize. *Genetics* **140**: 1087-1098 (1995).
- Hirotsune S, Hatada I, Komatsubara H, Nagai H, Kuma K, Kobayakawa K, Kawara T, Nakagawara A, Fujii K, Mukai T: New approach for detection of amplification in cancer DNA using restriction landmark genomic scanning. *Cancer Research* **52**: 3642-3647 (1992):
- Hohn B, Puchta H: Some like it sticky: targeting of the rice gene *Waxy*. *Trends in Plant Science* **8**: 51-53 (2003).
- Holm PB, Knudsen S, Mouritzen P, Negri D, Olsen FL, Roue C: Regeneration of Fertile Barley Plants from Mechanically Isolated Protoplasts of the Fertilized Egg Cell. *Plant Cell* **6**: 531-543 (1994).
- Houba-Herin N, Becker D, Post A, Larondelle Y, Starlinger P: Excision of a *Ds*-like maize transposable element (*Ac delta*) in a transient assay in Petunia is enhanced by a truncated coding region of the transposable element *Ac*. *Molecular and General Genetics* **224**: 17-23 (1990).
- Ish-Horowicz D, Burke JF: Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research* **9**: 2989-2998 (1981).

-
- Jähne A, Becker D, Brettschneider R, Lörz H: Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. *Theoretical and Applied Genetics* **89**: 525-533 (1994).
- Jarvis P, Belzile F, Dean C: Inefficient and incorrect processing of the *Ac* transposase transcript in *iae1* and wild-type *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **11**: 921-931 (1997).
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW: GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **6**: 3901-3907 (1987).
- Kaeppeler SM, Phillips RL: Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **90**: 8773-8776 (1993).
- Kasha KJ, Ziauddin A, Cho U-H: Haploids in cereal improvement: Anther and microspore culture. In: Gustafson JP Hrsg. *Gene Manipulation in Plant Improvement II*. Plenum Press, New York 213-235 (1990).
- Kasha KJ, Simion E, Oro R, Yao QA, Hu TC, Carlson AR: An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica* **120**: 379-385 (2001 a).
- Kasha KJ, Hu TC, Oro R, Simion E, Shim YS: Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1227-1238 (2001 b).
- Keith B, Chua N-H: Monocot and dicot pre-mRNAs are processed with different efficiencies in transgenic tobacco. *The EMBO Journal* **5**: 2419 -2425 (1986).
- Keller J, Lim E, James DW Jr, Dooner HK: Germinal and somatic activity of the maize element *Activator (Ac)* in *Arabidopsis*. *Genetics* **131**: 449-459 (1992).
- Keller J, Jones JD, Harper E, Lim E, Carland F, Ralston EJ, Dooner HK: Effects of gene dosage and sequence modification on the frequency and timing of transposition of the maize element *Activator (Ac)* in tobacco. *Plant Molecular Biology* **21**: 157-170 (1993).
- Kilby NJ, Leyser HM, Furner IJ: Promoter methylation and progressive transgene inactivation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **20**: 103-112 (1992).
- Kim CM, Je BI, Piao HL, Par SJ, Kim MJ, Park SH, Park JY, Park SH, Lee EK, Chon NS, Won YJ, Lee GH, Nam MH, Yun DW, Lee MC, Cha YS, Le Kon H, Eun MY, Han CD: Reprogramming of the activity of the *Activator/Dissociation* transposon family during plant regeneration in rice. *Molecules and Cells* **31**: 231-237 (2002).

- Kim CM, Piao HL, Park SJ, Chon NS, Je BI, Sun B, Park SH, Park JY, Lee EJ, Kim MJ, Chung WS, Lee KH, Lee YS, Lee JJ, Won YJ, Yi G, Nam MH, Cha YS, Yun DW, Eun MY, Han CD: Rapid, large-scale generation of *Ds* transposant lines and analysis of the *Ds* insertion sites in rice. *The Plant Journal* **39**: 252-263 (2004).
- Koprek T, McElroy D, Louwarse J, Williams-Carrier R, Lemaux PG: Negative selection systems for transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.): comparison of bacterial *codA*- and cytochrome P450 gene-mediated selection. *The Plant Journal* **19**: 719-726 (1999).
- Koprek T, McElroy D, Louwarse J, Williams-Carrier R, Lemaux PG: Technical advance: An efficient method for dispersing *Ds* elements in the barley genome as a tool for determining gene function. *The Plant Journal* **24**: 253-263 (2000).
- Koprek T, Rangel S, McElroy D, Louwarse JD, Williams-Carrier RE, Lemaux PG: Transposon-mediated single-copy gene delivery leads to increased transgene expression stability in barley. *Plant Physiology* **125**: 1354-1362 (2001).
- Kranz E, Lörz H: In Vitro Fertilization with Isolated, Single Gametes Results in Zygotic Embryogenesis and Fertile Maize Plants. *The Plant Cell* **5**: 739-746 (1993).
- Kumar S, Fladung M: Transgene repeats in aspen: molecular characterisation suggests simultaneous integration of independent T-DNAs into receptive hotspots in the host genome. *Molecular and General Genetics* **264**: 20-28 (2000).
- Kumpatla SP, Teng W, Buchholz WG, Hall TC: Epigenetic transcriptional silencing and 5-azacytidine-mediated reactivation of a complex transgene in rice. *Plant Physiology* **115**: 361-373 (1997).
- Kunze R, Stochaj U, Laufs J, Starlinger P: Transcription of the transposable element *Activator* (*Ac*) of *Zea mays* L. *The EMBO Journal* **6**: 1555-1563 (1987).
- Kunze R, Starlinger P, Schwartz D: DNA methylation of the maize transposable element *Ac* interferes with its transcription. *Molecular and General Genetics* **214**: 325-327 (1988).
- Kunze R, Starlinger P: The putative transposase of transposable element *Ac* from *Zea mays* L. interacts with subterminal sequences of *Ac*. *The EMBO Journal* **8**: 3177-3185 (1989).
- Kunze R, Behrens U, Courage-Franzkowiak U, Feldmar S, Kühn S, Lütticke R: Dominant transposition-deficient mutants of maize *Activator* (*Ac*) transposase. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **90**: 7094-7098 (1993).
- Kunze R, Kühn S, Jones JDG, Scofield SR: Somatic and germinal activities of maize *Activator* (*Ac*) transposase mutants in transgenic tobacco. *The Plant Journal* **8**: 45-54 (1995).

-
- Kunze R, Saedler H, Lönnig WE: Plant Transposable Elements. In: Callow JA Hrsg. *Advances in Botanical Research incorporating Advances in Plant Pathology*. San Diego: Academic Press 332-470 (1997).
- Kunze R, Weil CF: The *hAT* and *CACTA* Superfamilies of Plant Transposons. In: *Mobile DNA II*. Craig NL Hrsg. Washington D.C. ASM Press. 565-609 (2002).
- Laski FA, Rio DC, Rubin GM: Tissue specificity of *Drosophila P* element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* **44**: 7-19 (1986).
- Lazarow K: Ein *gene trap*-System in Gerste (*Hordeum vulgare* L.): Etablierung und Charakterisierung von *gene trap*-Linien. Dissertation, Universität Hamburg (2006).
- Lemaux PG, Cho M-J, Louwse J, Williams R, Wan Y: Bombardment-Mediated Transformation Methods for Barley. *BioRad Bulletin* **2007** (1996).
- Levy AA, Fridlender M, Hanania U, Rubin E, Sitrit Y: Binding of *Nicotiana* nuclear proteins to the subterminal regions of the *Ac* transposable element. *Molecular and General Genetics* **251**: 436-440 (1996).
- Li MG, Starlinger P: Mutational analysis of the N terminus of the protein of maize transposable element *Ac*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **87**: 6044-6048 (1990).
- Li W-Z, Song Z-H, Guo B-T, Xu L-J: The effects of DNA hypomethylating drugs on androgenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant* **37**: 605-608 (2001).
- Linn F, Heidmann I, Saedler H, Meyer P: Epigenetic changes in the expression of the maize *Al* gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. *Molecular and General Genetics* **222**: 329-336 (1990).
- Lippman Z, May B, Yordan C, Singer T, Martienssen R: Distinct Mechanisms Determine Transposon Inheritance and Methylation via Small Interfering RNA and Histone Modification. *PLOS Biology* **1**: 420-428 (2003).
- Lippman Z, Gendrel AV, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, McCombie WR, Lavine K, Mittal V, May B, Kasschau KD, Carrington JC, Doerge RW, Colot V, Martienssen R: Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* **430**: 471-476 (2004).
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF: Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* **8**: 457-463 (1995).

-
- Long D, Martin M, Sundberg E, Swinburne J, Puangsomlee P, Coupland G: The maize transposable element system *Ac/Ds* as a mutagen in *Arabidopsis*: identification of an albino mutation induced by *Ds* insertion. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **90**: 10370-10374 (1993).
- Ludwig SR, Habera LF, Dellaporta SL, Wessler SR: *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the *myc*-homology region. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **86**: 7092-7096 (1989).
- Madlung A, Comai L: The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of Botany* **94**: 481-495 (2004).
- Manninen I, Schulman AH: *BARE-1*, a *copia*-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology* **22**: 829-846 (1993).
- Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L, Scambia G: Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological Procedures Online* **3**: 19-25 (2001).
- Martin DJ, Firek S, Moreau E, Draper J: Alternative processing of the maize *Ac* transcript in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **11**: 933-943 (1997).
- Martin W, Gierl A, Saedler H: Molecular evidence for pre-Cretaceous angiosperm origins. *Nature* **339**: 46-48 (1989).
- Martinez P, Martin W, Cerff R: Structure, evolution and anaerobic regulation of a nuclear gene encoding cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from maize. *Journal of Molecular Biology* **208**: 551-565 (1989).
- Masson P, Rutherford G, Banks JA, Fedoroff N: Essential large transcripts of the maize *Spm* transposable element are generated by alternative splicing. *Cell* **58**: 755-765 (1989).
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S: Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (*TILLING*) for Plant Functional Genomics. *Plant Physiology* **123**: 439-442 (2000).
- McClintock B: Cytogenetic studies of maize and *Neurospora*. In: Year Book. Carnegie Institution of Washington **46**: 146-152 (1947).
- McClintock B: Mutable genetic loci in maize. In: Year Book. Carnegie Institution of Washington **47**: 155-169 (1948).
- McClintock B: The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **36**: 344-355 (1950).

-
- McClintock B: Mutable genetic loci in maize. In: Year Book. Carnegie Institution of Washington **50**: 174-181 (1951).
- McClintock B: Induction of Instability at Selected Loci in Maize. *Genetics* **38**: 579-99 (1953).
- McElroy D, Zhang W, Cao J, Wu R: Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell* **2**: 163-171 (1990).
- McElroy D, Blowers AD, Jenes B, Wu R: Construction of expression vectors based on the rice *actin 1 (Act1)* 5' region for use in monocot transformation. *Molecular and General Genetics* **231**: 150-160 (1991).
- McElroy D, Louwense JD, McElroy SM, Lemaux PG: Development of a simple transient assay for *Ac/Ds* activity in cells of intact barley tissue. *The Plant Journal* **11**: 157-165 (1997).
- McGuire TC, Lacy PA, O'Rourke KI: *P. hortense* GAPDH mRNA for glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Pubmed-Zugangs-Nummer: X60344. Unveröffentlicht.
- McKenzie N, Wen LY, Dale J: Tissue-culture enhanced transposition of the maize transposable element *Dissociation* in *Brassica oleracea* var. 'Italica'. *Theoretical and Applied Genetics* **105**: 23-33 (2002).
- McKenzie N, Dale PJ: Mapping of transposable element *Dissociation* inserts in *Brassica oleracea* following plant regeneration from streptomycin selection of callus. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 333-341 (2004).
- Meng L, Bregitzer P, Zhang S, Lemaux PG: Methylation of the exon/intron region in the *Ubi1* promoter complex correlates with transgene silencing in barley. *Plant Molecular Biology* **53**: 327-40 (2003).
- Meyer P, Heidmann I, Niedenhof I: Differences in DNA-methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. *The Plant Journal* **4**: 89-100 (1993).
- Mittelsten-Scheid O, Paszkowski J, Potrykus I: Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* **228**: 104-112 (1991).
- Montag K, Salamini F, Thompson RD: *ZEMa*, a member of a novel group of MADS box genes, is alternatively spliced in maize endosperm." *Nucleic Acids Research* **23**: 2168-2177 (1995).
- Mordhorst AP, Lörz H: Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.). Mikrosperes are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in the culture media. *Journal of Plant Physiology* **142**: 485-492 (1993).

-
- Müller-Neumann M, Yoder JJ, Starlinger P: The DNA sequence of the transposable element *Ac* of *Zea mays* L. *Molecular and General Genetics* **198**: 19-24 (1984).
- Murai N, Li ZJ, Kawagoe Y, Hayashimoto A: Transposition of the maize *activator* element in transgenic rice plants. *Nucleic Acids Research* **19**: 617-622 (1991).
- Murashige T, Skoog F: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology of the Plant* **15**: 473-497 (1962).
- Naimski P, Bierzynski A, Fikus M: Quantitative fluorescent analysis of different conformational forms of DNA bound to the Dye, 4',6-diamidine-2-phenylindole, and separated by gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **106**: 471-475 (1980).
- Nash J., Luehrsen K. R., Walbot V: *Bronze-2* Gene of Maize: Reconstruction of a Wild-Type Allele and Analysis of Transcription and Splicing. *The Plant Cell* **2**: 1039-1049 (1990).
- Nash J, Walbot V: *Bronze-2* Gene Expression and Intron Splicing Patterns in Cells and Tissues of *Zea mays* L.. *Plant Physiology* **100**: 464-471 (1992).
- Nussaume L, Harrison K, Klimyuk V, Martienssen R, Sundaresan V, Jones JDG: Analysis of splice donor and acceptor site function in a transposable gene trap derived from the maize element *Activator*. *Molecular and General Genetics* **249**: 91-101 (1995).
- Ochmann H, Gerber AS, Hartl D: Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**: 621-623 (1988).
- Olsen FL: Induction of Microspore Embryogenesis in cultured Anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of Ammonium Nitrate, Glutamine und Asparagine as Nitrogene Sources. *Carlsberg Research Communications* **52**: 393-404 (1987).
- Olsen FL: Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas* **115**: 255-266 (1991).
- Pallotta MA, Graham RD, Langridge P, Sparrow DHB, Barker SJ: RFLP mapping of manganese efficiency in barley. *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 1100-1108 (2000).
- Pannetier C, Delassus S, Darche S, Saucier C, Kourilsky P: Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Research* **21**: 577-583 (1993).
- Pasternak TP, Rudas VA, Lörz H, Kumlehn J: Embryogenic callus formation and plant regeneration from leaf base segments of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology* **155**: 371-375 (1999).

-
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D, Feher A: The Role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology* **129**:1807-1819 (2002).
- Pawlowski WP, Somers DA: Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **95**: 12106-12110 (1998).
- Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H: The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *The EMBO Journal* **6**: 3553-3558 (1987).
- Peterhans A, Datta SK, Datta K, Goodall GJ, Potrykus I, Paszkowski J: Recognition efficiency of Dicotyledoneae-specific promoter and RNA processing signals in rice. *Molecular and General Genetics* **222**: 361-368 (1990).
- Planckaert F, Walbot V: Molecular and genetic characterization of *Mu* transposable elements in *Zea mays*: behavior in callus culture and regenerated plants. *Genetics* **123**: 567-578 (1989).
- Pohlman RF, Fedoroff NV, Messing J: The nucleotide sequence of the maize controlling element *Activator*. *Cell* **37**: 635-643 (1984).
- Puchta H, Kocher S, Hohn B: Extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells is fast and is not affected by CpG methylation. *Molecular Cell Biology* **12**: 3372-3379 (1992).
- Puchta H: Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics* **152**: 1173-1181 (1999).
- Purugganan MD: Transposable elements as introns: evolutionary connections. *Trends in Ecology & Evolution* **8**: 239-243 (1993).
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE: *Biology of Plants*. 5. Auflage. New York Worth (1992).
- Register JC, Peterson DJ, Bell PJ, Bullock WP, Evans IJ, Frame B, Greenland AJ, Higgs NS, Jepson I, Jiao S: Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. *Plant Molecular Biology* **25**: 951-961 (1994).
- Ros F, Kunze R: Regulation of *activator/dissociation* transposition by replication and DNA methylation. *Genetics* **157**: 1723-1733 (2001).

-
- Saedler H, Nevers P: Transposition in plants: a molecular model. *The EMBO Journal* **4**: 585-590 (1985).
- Sambrook J, Fritsch ET, Maniatis T: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- Schein S, Kunze R, Starlinger P: A reexamination of *Ac* transcript quantification. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* **64** (1990).
- Scholz S: Das *Ac*-Element aus *Zea mays* L. in Gerste (*Hordeum vulgare* L.): Nachweis der Transposition und Ansätze zur Transposon-Mutagenese. Dissertation, Universität Hamburg (2000).
- Scholz S, Lörz H, Lütticke S: Transposition of the maize transposable element *Ac* in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular and General Genetics* **264**: 653-661 (2001).
- Scofield SR, Harrison K, Nurrish SJ, Jones JD: Promoter fusions to the *Activator* transposase gene cause distinct patterns of *Dissociation* excision in tobacco cotyledons. *The Plant Cell* **4**: 573-82 (1992).
- Scofield SR, English JJ, Jones JDG: High level expression of the *Activator* (*Ac*) transposase gene inhibits the excision of *Dissociation* (*Ds*) in tobacco cotyledons. *Cell* **75**: 507-517 (1993).
- Scortecci KC, Dessaux Y, Petit A, Van Sluys MA: Somatic excision of the *Ac* transposable element in transgenic *Arabidopsis thaliana* after 5-azacytidine treatment. *Plant Cell Physiology* **38**: 336-343 (1997).
- Scortecci KC, Raina R, Fedoroff NF, Van Sluys MA: Negative effect of the 5'-untranslated leader sequence on *Ac* transposon promoter expression." *Plant Molecular Biology* **40**: 935-944 (1999).
- Shalev G, Levy AA: The maize transposable element *Ac* induces recombination between the donor site and an homologous ectopic sequence. *Genetics* **146**: 1143-1151 (1997).
- Shapiro DJ: Quantitative ethanol precipitation of nanogram quantities of DNA and RNA. *Analytical Biochemistry* **110**: 229-231 (1981).
- Simpson GG, Filipowicz W: Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. *Plant Molecular Biology* **32**: 1-41 (1996).
- Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-517 (1975).

-
- Svitashev SK, Pawlowski WP, Makarevitch I, Plank DW, Somers DA: Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *The Plant Journal* **32**: 433-445 (2002).
- Swinburne J, Balcells L, Scofield SR, Jones JD, Coupland G: Elevated levels of *Activator* transposase mRNA are associated with high frequencies of *Dissociation* excision in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**: 583-595 (1992).
- Takumi S: Hygromycin-resistant calli generated by activation and excision of maize *Ac/Ds* transposable elements in diploid and hexaploid wheat cultured cell lines. *Genome* **39**: 1169-1175 (1996).
- Takumi S, Murai K, Mori N, Nakamura C: Variations in the maize *Ac* transposase transcript level and the *Ds* excision frequency in transgenic wheat callus lines. *Genome* **42**: 1234-1241 (1999).
- Terada R, Urawa H, Inagaki Y, Tsugane K, Iida S: Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nature Biotechnology* **20**: 1030-1034 (2002).
- Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thornton S, Brettel R: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant Journal* **11**: 1369-1376 (1997).
- Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP: Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Research* **59**: 2307-2312 (1999).
- Van der Biezen E, Van Haaren MJJ, Overduin B, Nijkamp HJJ, Hille J: Heterologous transposon tagging as a tool for the isolation of plant genes. *Plant Molecular Biology Manual* **K2**: 1-16 (1994).
- Varagona MJ, Purugganan M, Wessler SR: Alternative Splicing Induced by Insertion of Retrotransposons into the Maize *waxy* Gene. *The Plant Cell* **4**: 811-820 (1992).
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K: Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Research* **6**: 3543-3557 (1979).
- Wan Y, Lemaux PG: Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology* **104**: 37-48 (1994).
- Wang L, Heinlein M, Kunze R: Methylation pattern of *Activator* transposase binding sites in maize endosperm. *Plant Cell* **8**: 747-758 (1996).
- Wang L, Kunze R: Methylation of transposase binding sites at the 5'-end of *Ac* differs in the active and inactive states of the element. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* **70** (1996).

-
- Wang L, Kunze R: Transposase binding site methylation in the epigenetically inactivated *Ac* derivative *Ds-cy*. *The Plant Journal* **13**: 577-582 (1998).
- Wang Z-Y, Zheng F-Q, Shen G-Z, Gao J-P, Snustad DP, Li M-G, Zhang J-L, Hong M-M: The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the *waxy* gene. *The Plant Journal* **7**: 613 (1995).
- Weil CF, Kunze R: Transposition of maize *Ac/Ds* transposable elements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Genetics* **26**: 187-190 (2000).
- Weil CF, Wessler SR: The Effects of Plant Transposable Element Insertion on Transcription Initiation and RNA Processing. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 527-552 (1990).
- Wessler SR: The maize transposable *Ds1* element is alternatively spliced from exon sequences. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 6192-6196 (1991).
- Widholm JM: The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining the viability of cultured plant cells. *Stain Technology* **47**: 189-194 (1972).
- Wilkening S, Hemminki K, Thirumaran RK, Bermejo JL, Bonn S, Forsti A, Kumar R: Determination of allele frequency in pooled DNA: comparison of three PCR-based methods. *Biotechniques* **39**: 853-858 (2005).
- Willing RP, Mascarenhas JP: Analysis of the Complexity and Diversity of mRNAs from Pollen and Shoots of *Tradescantia*. *Plant Physiology* **75**: 865-868 (1984).
- Xiao YL, Li X, Peterson T: *Ac* insertion site affects the frequency of transposon-induced homologous recombination at the maize *p1* locus. *Genetics* **156**: 2007-2017 (2000).
- Ye X, Wang Z-Y, Wu X, Potrykus I, Spangenberg G: Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Cell Reports* **16**: 379-384 (1997).
- Yin Z, Plader W, Malepszy S: Transgene inheritance in plants. *Journal of Applied Genetics* **45**: 127-144 (2004).
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH: Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics* **13**: 335-340 (1997).
- Zuker M, Mathews DH, Turner DH: Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology. In: Barciszewski und Clark Hrsg. NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers (1999).